

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS
TERAPÉUTICAS POTENCIALES E INHIBIDORES DEL
SISTEMA UBIQUITINA PROTEASOMA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA MALARIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Presentada por

Lydia Mata Cantero

Director

Manuel S. Rodríguez Medina

Madrid, 2018

© Lydia Mata Cantero, 2017

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS
TERAPÉUTICAS POTENCIALES E
INHIBIDORES DEL SISTEMA UBIQUITINA
PROTEASOMA PARA EL TRATAMIENTO DE
LA MALARIA**

TESIS DOCTORAL



**Lydia Mata Cantero
1/1/2017**



Manuel S. Rodríguez, Dr. en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Centro Nacional de la Investigación Científica (CNRS)

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado *“Identificación de nuevas dianas terapéuticas potenciales e inhibidores del Sistema Ubiquitina Proteasoma para el tratamiento de la malaria”* que presenta **Lydia Mata Cantero**, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el departamento de Ubiquitinación y Biología Molecular del Cáncer de CICbioGUNE (Bilbao), en el departamento de Ubiquitinación y Biología Molecular de Inbiomed (San Sebastián), y en la empresa farmacéutica GlaxoSmithKline (Madrid), a través de la colaboración entre las distintas instituciones.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada tesis doctoral.

En Madrid, a 10 de Marzo de 2017.

Dr. Manuel S. Rodríguez

***“La fuerza y el crecimiento vienen
sólo a través del esfuerzo y la
lucha continua”***

Napoleón Hill

AGRADECIMIENTOS

Ha sido muy larga la carrera hasta llegar aquí y no lo habría conseguido sin la ayuda de muchísimas personas, por lo que se me hace muy difícil plasmar todos mis agradecimientos. Han sido muchos los cambios y la gente de la que he aprendido y compartido momentos increíbles, y gracias a la cuál hoy estoy aquí.

La presente tesis doctoral ha sido fruto de la colaboración entre la empresa farmacéutica GlaxoSmithKline con el grupo del Dr. Manuel S. Rodríguez. Aunque empezó siendo un proyecto de menos de dos años financiado por la fundación Openlab, a la que quisiera dar las gracias, se ha convertido en una tesis doctoral especialmente por el apoyo de Manuel, Julio Martín y Maria Gómez. Su confianza y perseverancia han sido esenciales para que el proyecto continuase en mi estancia a lo largo de las distintas instituciones y departamentos. Han sido una pieza clave en mi desarrollo científico y los mejores mentores que he podido tener a lo largo de estos años. Sin lugar a duda habéis hecho esto posible.

Gracias a Julio Martin, por su confianza y apoyo aún cuando era una novata, y por brindarme la oportunidad de empezar con el proyecto y luchar siempre por su continuación. Por mostrarme lo que es el trabajo en equipo y lo enriquecedor que puede resultar, y estar siempre dispuesto a ayudar y a colaborar.

Al resto de la gente del CIB de Glaxo, por hacerme sentir parte de la plantilla desde el primer día, por sus enseñanzas en mis inicios en el mundo del screening, en el análisis de datos y en el desarrollo de ensayos. A pesar de los problemas, siempre estuvisteis dispuestos a colaborar con una sonrisa. Gracias a Concha, Chus y a Fernando por haber creído en el proyecto y haberme permitido compaginarlo con el trabajo en GSK. A Fini, Cleo y Vero por vuestra amistad y todos los momentos de café-GSK. Gracias a Vanesa e Imanol por todos los momentos de risas que pasamos juntos, tanto en GSK como fuera. La sala 8 dio para muchos momentos. Gracias también a Imanol por sus consejos y ayuda y por haberme enseñado tantísimo, aunque no haya podido retener ni la mitad.

Gracias a mi director de tesis, Manuel Rodríguez por su paciencia en responder a todas mis preguntas, que no son pocas, por su cariño y por ser tan buena gente. Gracias por su esfuerzo, especialmente durante el análisis y escritura del paper del MS. Por todas las oportunidades ofrecidas y sobre todo por su confianza y delegación en mí, a pesar de la distancia. A sus chicas Wendy, Eli, Sofi, Valerie y Fabienne, por integrarme dentro de su pequeña familia estando lejos de casa, tanto en el CICbioGUNE como en Inbiomed. Gracias

por acogerme en vuestra casa y estar siempre tan dispuestas a ayudar. Gracias también a Mikel del CICbioGUNE por todo el esfuerzo y tiempo dedicado al análisis de datos del MS y toda su dedicación al proyecto.

Gracias a Alfonso Mendoza y a Ruben González de la TB DPU, por su ayuda y consejo durante mi estancia de openlab y por integrarme en el grupo.

Gracias a mi jefa Maria Gómez de la malaria DPU, por enseñarme tanto, creer en el proyecto y poner tanto esfuerzo en él, especialmente para entender mis inmensas tablas de excel. Gracias por su ayuda de cada día, sus consejos y ánimos, por preocuparse tanto por el equipo y por su positividad, que nos ayuda siempre a seguir trabajando en conseguir los objetivos a pesar de las dificultades.

Al resto de gente del DDW, sobre todo a la malaria DPU, por permitirme compaginar el proyecto con nuestro trabajo diario y contribuir de alguna manera a que esto saliese adelante. Gracias a mis chicas “malariasas” y “proteómicas”, Virginia, Sara, Olalla y Gracia. Por brindarme día a día su amistad, por las confidencias compartidas y sus enseñanzas de “chicas de verdad”. También a Nando, Daniela, Cynthia, María Roncales y Ramón. Gracias a todos por vuestra amistad y apoyo, por escucharme y aguantar de vez en cuando mis frikadas, sufrir esta tesis casi tanto como yo, y por todas las risas y momentos vividos.

También agradecer a mis amigos, que ya sabéis quienes sois, por sacarme una sonrisa siempre que lo he necesitado, por obligarme a salir y hacer que desconecte a lo largo de tantos años.

A Miguel Ángel por su comprensión y apoyo en los momentos difíciles y sobre todo por creer en mí más de lo que yo lo he hecho siempre. Y por supuesto, gracias a mi familia a los que les debo todo. A mi madre por su amor y apoyo incondicional, y por saber cómo tranquilizarme en los momentos más difíciles desde el instituto, donde cada examen era un mundo. A mi mejor amiga y hermana Ana. Gracias por estar siempre a mi lado, por su sinceridad que me hace crecer, y por darme siempre fuerzas para seguir adelante. A mi padre. Por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme lo que es el esfuerzo y la humildad y todo lo que es realmente importante en la vida. Ese sí que es mi mayor aprendizaje y lo que llevaré siempre conmigo. GRACIAS.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	4
ABREVIATURAS	5
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. LA MALARIA COMO ENFERMEDAD.....	21
<i>2.1.1. Generalidades, manifestaciones clínicas e impacto de la malaria.....</i>	<i>21</i>
<i>2.1.2. Ciclo de vida de Plasmodium</i>	<i>23</i>
<i>2.1.3. Historia de la malaria y sus tratamientos</i>	<i>28</i>
<i>2.1.4. Impacto y estrategias actuales para el control de la malaria.....</i>	<i>33</i>
2.2. EL UPS COMO DIANA TERAPEÚTICA	37
<i>2.2.1. Componentes del UPS</i>	<i>37</i>
<i>2.2.2. Métodos de estudio del UPS.....</i>	<i>49</i>
2.2.2.1. Métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas.....	50
2.2.2.2. Análisis por espectrometría de masas	57
<i>2.2.3. Métodos de identificación de nuevos inhibidores del UPS</i>	<i>59</i>
2.2.3.1. Proteasoma	60
2.2.3.2. Enzimas conjugadoras de ubiquitina	65
2.2.3.3. DUBs	70
2.3. EL UPS COMO ANTIMALÁRICO	75
<i>2.3.1. Componentes del UPS en P. falciparum.....</i>	<i>75</i>
<i>2.3.2. Proteínas reguladas por el UPS en P. falciparum.....</i>	<i>82</i>
<i>2.3.3. UPS como antimalárico</i>	<i>84</i>
3. OBJETIVOS.....	95
4. TRABAJOS EXPERIMENTALES PUBLICADOS	99
4.1. CAPÍTULO 1. MAGNETIC ISOLATION OF PLASMODIUM FALCIPARUM SCHIZONTS IRBCS TO GENERATE A HIGH PARASITAEMIA AND SYNCHRONIZED IN VITRO CULTURE	101
4.2. CAPÍTULO 2. ISOLATION OF THE UBIQUITIN-PROTEOME FROM TUMOR CELL LINES AND PRIMARY CELLS USING TUBES.....	123

4.3. CAPÍTULO 3. NEW INSIGHTS INTO HOST-PARASITE UBIQUITIN PROTEOME DYNAMICS IN <i>P. FALCIPARUM</i> INFECTED RED BLOOD CELLS USING A TUBES-MS APPROACH	143
4.4. CAPÍTULO 4. DEVELOPMENT OF TWO NOVEL HIGH-THROUGHPUT ASSAYS TO QUANTIFY UBIQUITYLATED PROTEINS IN CELL LYSATES: APPLICATION TO SCREENING OF NEW ANTIMALARIALS	201
5. DISCUSIÓN GENERAL	235
5.1. CAPÍTULO 1. ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO <i>IN VITRO</i> SINCRÓNICO A ALTA PARASITEMIA. ...	237
5.2. CAPÍTULO 2. ESTABLECIMIENTO DE UN MÉTODO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS Y SUS PROTEÍNAS DE INTERACCIÓN	243
5.3. CAPÍTULO 3. ANÁLISIS DEL UBIQUITOMA DE <i>P. FALCIPARUM</i> Y SU HOSPEDADOR A LO LARGO DE SU CICLO DE INFECCIÓN INTRAERITROCÍTICO.....	246
5.3.1. <i>Análisis global y comparativa con trabajos publicados.....</i>	<i>246</i>
5.3.2. <i>Análisis de los componentes del UPS.....</i>	<i>250</i>
5.3.3. <i>Análisis de los procesos regulados por el UPS en el ERITROCITO durante la infección.....</i>	<i>252</i>
5.3.4. <i>Análisis de los procesos regulados por el UPS en el PARÁSITO</i>	<i>264</i>
5.4. CAPÍTULO 4. ESTABLECIMIENTO DE DOS MÉTODOS HTS PARA CUANTIFICAR LOS NIVELES DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS EN LISADOS CELULARES: APLICACIÓN PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS ANTIMALÁRICOS.....	277
6. CONCLUSIONES	285
7. BIBLIOGRAFÍA.....	289
8. ANEXO	313
ANEXO I. THE UBIQUITIN PROTEASOME SYSTEM (UPS) AS A CANCER DRUG TARGET: EMERGING MECHANISMS AND THERAPEUTICS.....	315

ÍNDICE DE FIGURAS

**Las figuras creadas “de novo” son aquellas en las cuales no se indica la fuente.*

INTRODUCCIÓN

Figura I. 1. Población en riesgo de sufrir Malaria en 2014	22
Figura I. 2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium ssp.</i>	24
Figura I. 3. Estructuras químicas de las principales clases de antimaláricos	31
Figura I. 4. Mapa de resistencias frente a antimaláricos.....	33
Figura I. 5. Transmisión de la malaria en el siglo XX	34
Figura I. 6. Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS).....	39
Figura I. 7. Tipos de DUBs.....	41
Figura I. 8. Representación de la ubiquitina.....	43
Figura I. 9. Formas de ubiquitinación.....	44
Figura I. 10. Representación del proteasoma.....	48
Figura I. 11. Métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas.....	53
Figura I. 12. Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante TUBEs.....	55
Figura I. 13. Preparación de las muestras para su identificación por MS.	58
Figura I. 14. Ensayo de actividad fluorogénica para medir la actividad del proteasoma.....	61
Figura I. 15. Ensayos celulares con sustratos de proteasoma recombinantes.....	63
Figura I. 16. Sondas químicas de proteasoma.....	64
Figura I. 17. Métodos de cribado para la búsqueda de nuevos inhibidores	69
Figura I. 18. Sondas químicas de DUBs.....	73
Figura I. 19. Modelo del control de calidad de proteínas ERAD en <i>P. falciparum</i>	78
Figura I. 20. Análisis bioinformático de los componentes ERAD de <i>P. falciparum</i>	79
Figura I. 21. Protocolo de purificación del proteasoma mediante dominios UBL.....	80
Figura I. 22. Procesos regulados por el UPS en <i>P. falciparum</i> según <i>Ponts et al.</i> 2011	83
Figura I. 23. Procesos regulados por el proteasoma en <i>P. falciparum</i> según <i>Wang et al.</i> 2015	84
Figura I. 24. Inhibidores selectivos de subunidad en humano con distinta selectividad en <i>P. falciparum</i>	87
Figura I. 25. Estructura del proteasoma 20S de <i>P. falciparum</i> por cryo-EM	89

Figura I. 26. Estudio de especificidad de los nuevos inhibidores de proteasoma péptido vinil sulfonas	90
--	----

Figura I. 27. Comparación de la accesibilidad del compuesto WLW-vs a los sitios activos β 2 de humano y <i>P. falciparum</i>	91
---	----

CAPÍTULO 1

Figure 1. 1. Isolation of schizonts enriched <i>Plasmodium falciparum</i> infected red blood cells with vario mac magnetic columns.	110
---	-----

Figure 1. 2. Establishment of the haematocrit to obtain the highest invasion rate after magnetic columns purification	112
--	-----

Figure 1. 3. Establishment of the initial parasitaemia after magnetic column purification	114
--	-----

Figure 1. 4. Summary of the complete protocol	118
--	-----

CAPÍTULO 2

Figure 2. 1. Procedure to couple TUBEs/GST to GSH-agarose beads	128
--	-----

Figure 2. 2. Isolation of ubiquitylated proteins for MS analysis using TUBEs.....	129
--	-----

Figure 2. 3. Proteins captured by TUBEs for MS analysis	138
--	-----

CAPÍTULO 3

Figure 3. 1. Identification of ubiquitylated proteins using TUBEs-LC-MS/MS method	162
--	-----

Figure 3. 2. Ubiquitin chains found in uRBC and iRBC.	165
---	-----

Figure 3. 3. Ubiquitylation of the Ring exported protein 1 in association with components of the Maurer's clefts organelles	167
--	-----

Figure 3. 4. Venn diagrams of TUBEs enriched proteins identified by MS/MS analysis	169
---	-----

Figure 3. 5. Heatmap of average log(Ub/GST) ratios from <i>H. sapiens</i> and <i>P. falciparum</i> TUBE enriched proteins	171
--	-----

Figure 3. 6. Enrichment of components of the ubiquitin proteasome system in <i>P. falciparum</i> iRBCs.	174
---	-----

Figure 3. 7. <i>P. falciparum</i> DNA replication factors regulated by ubiquitylation.....	177
---	-----

Figure 3.S 1. Giemsa stain of iRBCs.....	191
---	-----

Figure 3.S 2. Counts extracted from survey scans for the peptide EKDEEQILkIR	192
---	-----

Figure 3.S 3. Venn diagrams for MS identified proteins with TUBE versus GST.....	193
Figure 3.S 4. Gene ontology enrichment analysis of biological processes.....	194
Figure 3.S 5. Gene ontology enrichment analysis of cellular component	195
Figure 3.S 6. Gene ontology enrichment analysis of molecular	196
Figure 3.S 7. Functional enrichment analysis.....	197
Figure 3.S 8. The UPS implication during <i>P. falciparum</i> infection of RBC.....	198
Figure 3.S 9. Clathrin-mediated endocytosis signalling pathway by Ingenuity	199
Figure 3.S 10. Comparison of the data obtained in this study with the data published by <i>Ponts et al.</i>	200

CAPÍTULO 4

Figure 4. 1. Analysis of ubiquitylated proteins along <i>Plasmodium falciparum</i> intra- erythrocytic cycle	214
Figure 4. 2. Schematic representation of the developed assays	216
Figure 4. 3. Optimization of the components of the AlphaLISA assay	218
Figure 4. 4. Optimization of the components of the TUBE-DELFI assay	221
Figure 4. 5. Correlation between AlphaLISA and DELFIA assays.....	225
Figure 4. 6. Assay robustness and validation.	227

DISCUSIÓN

Figura D. 1. Diagramas de Venn de las proteínas identificadas por MS en <i>P.</i> <i>falciparum</i> en los tres trabajos publicados	249
Figura D. 2. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo identificadas en el eritrocito.....	260
Figura D. 3. Ampliación de la vía de señalización de endocitosis mediada por clatrina (IPA) en la etapa de trofozoito.	263
Figura D. 4. Mecanismo de acción propuesto para los compuestos derivados de la Artemisinina, y su relación con la respuesta a estrés oxidativo y el UPS.....	270

ANEXO

Figure AI. 1. Available drugs in clinical trials to block the UPS.....	321
Figure AI. 2. Cellular effects of proteasome inhibition	330

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla I. 1. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas.....	56
---	----

CAPÍTULO 1

Table 1. 1. Number of infected red blood cells purified, starting from 100 ml of culture H = 1% and P = 10% (n = 8).....	111
Table 1. 2. Reproducibility of the final protocol using haematocrit 0.2 and initial parasitaemia of 10%	116
Table 1. 3. Effect of drugs on <i>Plasmodium falciparum</i> growth using cultures grown at low and high parasitaemia	116

CAPÍTULO 3

Table 3. 1. Ubiquitylated signatures found in <i>P. falciparum</i> iRBCs and uRBCs.....	164
--	-----

CAPÍTULO 4

Table 4. 1. Advantages and disadvantages of these new AlphaLISA and DELFIA assays.....	220
Table 4. 2. pIC50 and maximum percentage of stimulation of proteasome inhibitors in different assays.....	224

ANEXO

Table AI. 1. Proteasome inhibitors in clinical trials	324
Table AI. 2. Clinical trials for MLN4924	334
Table AI. 3. Inhibitors of Deubiquitylating enzymes in clinical trials.....	341
Table AI. 4. Inhibitors ubiquitin E3 ligases in clinical trials	345

ABREVIATURAS

ACTs:	Terapias basadas en la combinación con Artemisinina
APC:	Complejo promotor de la Anafase
BP:	Procesos biológicos
CC:	Componentes celulares
Cryo-EM:	Crio-Electron microscopía
CO:	Monóxido de carbono
DELFA:	Inmunoensayo de fluorescencia (Dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay)
DHA:	Dihidroartemisinina
DUBs:	Des-ubiquitininas
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ER:	Retículo endoplasmático
ERAD:	Degradación asociada al retículo endoplasmático
FDR:	Ratio de falsos positivos
FRET:	Fluorescencia de transferencia de energía (Fluorescence resonance energy transfer)
FP:	Fluorescencia polarizada
GST:	Glutation S- transferasa
GO:	Análisis de ontología genética
GR:	Glutation reductasa
GSH:	Glutation
HFF:	Fibroblastos humanos (Human foreskin fibroblasts)
HSP:	Proteínas “Heat shock”
HTRF:	Fluorescencia resuelta en el tiempo (High time resolved fluorescence)
HTS:	Cribado de alto rendimiento (High-throughput screening)
IAA:	Iodoacetamida
IPA:	Software “Ingenuity pathway analysis”
KAHRP:	Knob-associated histidine-rich protein
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida unida a espectrometría de masas
MAHRP1:	Membrane-associated His-rich protein 1

MESA: Mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen

MCMs: Mini-chromosome maintenance Proteins

MF: Funciones moleculares

MS: Espectrometría de masas

PCNA: Factor de progresión ADN polimerasa

RESA: Ring-infected erythrocyte surface antigen

REX1: Ring exported protein 1

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil-sulfato

TCAMs: Tres Cantos antimalarial set

TUBEs: Entidades de ubiquitina dispuestas en tándem

PfEMP3: *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3

PfSBP1: *P. falciparum* skeleton binding protein 1

Plasmodium falciparum: *P. falciparum*

Ub: Ubiquitina

UBA: Dominio asociado a ubiquitina

UBD: Dominios de unión a ubiquitina

UBL: Dominios similares a ubiquitina (Ubiquitin-like)

UCHs: Ubiquitina C-terminal hidrolasas

UIMs: Motivo de interacción a ubiquitina

UPR: Respuesta frente a proteínas mal plegadas (unfolded protein response)

UPS: Sistema Ubiquitina Proteasoma

USPs: Proteasas específicas de ubiquitina

1. Resumen

1. RESUMEN

La malaria es una de las enfermedades infecciosas que producen un mayor número de muertes en el mundo. La mayoría de los casos tienen lugar en África, Asia y parte de Sudamérica, teniendo un impacto en el desarrollo socioeconómico de los países más pobres.

Las formas más severas de malaria son producidas por la infección del parásito protista *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). *P. falciparum* posee un ciclo de vida complejo, ya que adopta diferentes formas a lo largo de su ciclo vital. La etapa intraeritrocítica es la etapa asociada con la patogénesis, siendo la más estudiada y la principal diana de los fármacos antimaláricos. Sin embargo, la aparición de resistencias frente a todos los antimaláricos conocidos, han llevado a la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos con mecanismos de acción novedosos, y a la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas.

El Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS) es una de las pocas dianas terapéuticas que pueden ser consideradas como validadas en *P. falciparum*. Los inhibidores de proteasoma humano inhiben el crecimiento del parásito, incluso en cepas resistentes a antimaláricos y en varias etapas de su ciclo de vida. Un número creciente de compuestos que inhiben alguno de los componentes del UPS humano se encuentran en fases clínicas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Sin embargo, existe la necesidad de encontrar compuestos que inhiban específicamente alguno de los componentes del UPS de *P. falciparum* con el fin de evitar cualquier tipo de toxicidad. A pesar de ello, el conocimiento del UPS de *P. falciparum* es limitado, dificultando el desarrollo de nuevos fármacos.

El UPS es una modificación postraduccional que controla numerosos procesos celulares esenciales como el ciclo celular, apoptosis, reparación del ADN, tráfico de proteínas, etc. Además, el UPS se ha asociado frecuentemente con interacciones entre patógeno y hospedador. Debido a que el sistema está implicado en las mayores respuestas celulares frente a la infección, muchos patógenos han desarrollado diferentes mecanismos para manipular los mecanismos celulares del

hospedador, interfiriendo con su maquinaria de ubiquitinación para su propio beneficio y por tanto sobrevivir. *P. falciparum* modifica el proteoma del eritrocito transformándolo en un nicho donde puede crecer y replicarse, pero los mecanismos por los cuales se producen todos estos cambios aún son desconocidos.

En este trabajo, las proteínas ubiquitinadas y proteínas de interacción, de *P. falciparum* y de eritrocitos infectados, han sido caracterizados a lo largo del ciclo intraeritrocítico, con el fin de comprender la implicación del UPS en las interacciones entre parásito y hospedador, así como los mecanismos regulados por el UPS en el parásito. Esto requirió el establecimiento de dos nuevas metodologías.

En primer lugar se estableció un método para obtener cultivos sincrónicos de *P. falciparum* a alta parasitemia, con el fin de enriquecer eritrocitos infectados y reducir el ruido proveniente de los eritrocitos no infectados, durante la identificación de las proteínas ubiquitinadas por espectrometría de masas (MS) (CAPÍTULO 1). El método combina sincronizaciones con percoll y sorbitol, la purificación con columnas magnéticas y la reducción del hematocrito para incrementar el ratio de invasión de *P. falciparum*. El método establecido es fácil, rápido y reproducible, y permite obtener parasitemias de alrededor de un 40%. Además, puede ser aplicado a todo tipo de estudios parasitológicos en los que se requiera alta sincronía y/o parasitemia.

El enriquecimiento de las proteínas ubiquitinadas se ve dificultado entre otras cosas por la inherente inestabilidad de los sustratos, que son expuestos al proteasoma, y por la gran regulación dinámica que existe entre la unión de ubiquitina, efectuada por las enzimas de conjugación, y su eliminación por las enzimas de des-ubiquitinación (DUBs). Por ello, se desarrolló una nueva metodología para purificar las proteínas ubiquitinadas y su posterior identificación por MS. Esta metodología está basada en el uso de las trampas TUBEs (tandem ubiquitin-binding entities), las cuales se unen covalentemente a bolas de agarosa, permitiendo la captura de las proteínas ubiquitinadas, preservando además las condiciones fisiológicas de las muestras. Dicho protocolo requirió de múltiples optimizaciones para reducir la interferencia proveniente de la hemoglobina e incrementar el número de proteínas ubiquitinadas identificadas. Los pasos se encuentran descritos en el CAPÍTULO 2.

Así, las proteínas ubiquitinadas y sus proteínas de interacción, provenientes de eritrocitos no infectados e infectados en diferentes estadios del ciclo intraeritrocítico del parásito (anillos, trofozoitos y esquizontes), fueron purificadas utilizando los métodos previamente establecidos. Las proteínas fueron analizadas por MS (CAPÍTULO 3), identificándose en total 1237 proteínas (683 humanas y 554 del parásito). Algunas de ellas presentaban la doble glicina (gly-gly), la cual es considerada como una “firma” de sitios de ubiquitinación dentro de las proteínas. Sin embargo, no todas las proteínas fueron consideradas para su análisis posterior, sino que se aplicó un filtro de enriquecimiento estadístico, con el fin de seleccionar aquellas proteínas del hospedador o el parásito con mayor representatividad en nuestro análisis. Para comprender los procesos regulados por el UPS, las proteínas filtradas (enriquecidas) fueron sometidas a varios análisis bioinformáticos, como el de ontología genética (GO) y el análisis por IPA (Ingenuity Pathway Analysis). Algunos de los resultados obtenidos fueron luego confirmados por ensayos de Western blot, utilizando anticuerpos específicos.

La mayoría de las proteínas enriquecidas identificadas pertenecían al UPS o eran potenciales sustratos de éste. Se observó que mientras que las proteínas ubiquitinadas del parásito incrementaban a lo largo del ciclo, alcanzando su pico más alto en la etapa de esquizontes, las proteínas del hospedador incrementaban tras la infección (anillos) pero luego disminuían con el ciclo. Esta intercomunicación entre el UPS de ambos organismos sugiere que durante la infección, el parásito lleva a la disminución de las funciones proteolíticas del hospedador, para así poder sobrevivir.

Además de esto, tras la infección se produjeron cambios significativos en las vías de señalización del eritrocito “plegado de proteínas”, “endocitosis mediada por clatrina” y “respuesta a estrés oxidativo mediado por NRF2” en la etapa de trofozoito. Las chaperonas eritrocíticas y los componentes del sistema TriC se vieron afectados. En la bibliografía pueden encontrarse ejemplos de la manipulación de ambos sistemas por parte de los patógenos en su propio beneficio.

En cuanto a *P. falciparum*, fueron las vías “replicación del ADN” en la etapa de esquizonte, “respuesta a estrés oxidativo mediado por NRF2” y “transporte de

proteínas y sistema *Maurer's cleft*" en la etapa de trofozoito, las que mostraron los cambios más significativos. Los resultados revelaron una regulación importante en la maquinaria de replicación del ADN de *P. falciparum* en la etapa de esquizonte, sugiriendo la ubiquitinación de un grupo de proteínas MCMs (Mini-chromosome Maintenance Proteins). La implicación del UPS en el sistema de secreción del parásito denominado *Maurer's cleft*, en la formación de estructuras de adherencia *Knobs* y en la remodelación del eritrocito, fue uno de los hallazgos más importantes de este trabajo. La ubiquitinación de REX1 fue confirmada, ya que se observaron formas de alto peso molecular por Western blot, así como aductos gly-gly en varios péptidos de la proteína, sobre todo en la etapa de trofozoito. REX1 es una proteína implicada en el sistema *Maurer's cleft*, siendo importante para la entrada de nutrientes desde el eritrocito. Por tanto, este trabajo podría ser la base para la identificación de una nueva diana terapéutica, aunque sería necesaria su validación química, así como futuros estudios de esencialidad.

En el CAPÍTULO 4 se describe otra estrategia llevada a cabo para la identificación de nuevos fármacos que actúen a través del UPS y/o de nuevas dianas terapéuticas químicamente validadas. Para ello, se desarrollaron dos ensayos celulares de alto rendimiento basados en la trampa TUBEs. Dichos ensayos permiten cuantificar el total de proteínas ubiquitinadas presentes en lisados celulares de *P. falciparum*, detectando cambios en sus niveles en presencia de inhibidores. Esto podría permitir identificar nuevos inhibidores de cualquier componente del UPS, sin necesidad de una validación previa o de la expresión de proteínas recombinantes.

El primer ensayo es un ensayo homogéneo en formato de 1536 pocillos basado en la tecnología AlphaLISA, que podría ser utilizado como ensayo primario para campañas de cribado de compuestos de alto rendimiento (HTS). El segundo ensayo por su parte, es un ensayo heterogéneo de DELFIA (dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay) en formato de 384 pocillos, que podría aplicarse para descartar falsos positivos asociados a la tecnología AlphaLISA o como ensayo primario en campañas con un menor número de compuestos. Este ensayo requiere varios pasos de lavado y por tanto, posee una mayor variabilidad al necesitar de una mayor manipulación. La principal ventaja es la disminución de

interferencias debidas a los compuestos u otros componentes del ensayo. La idoneidad de ambos ensayos para llevar a cabo campañas de HTS fue confirmada utilizando distintos inhibidores del proteasoma.

Además de ser útiles para identificar nuevos quimiotipos que actúen sobre cualquier componente del UPS en una campaña de HTS, también pueden ser el punto de partida para la identificación de nuevas dianas químicamente validadas, tras la deconvolución del mecanismo de acción de los compuestos identificados. Además, ambos ensayos podrían ser adaptados para identificar los niveles de ubiquitinación de proteínas específicas, cambiando tan solo el anticuerpo primario. Así, podría por ejemplo estudiarse el estado de ubiquitinación de proteínas identificadas en el CAPITULO 2, o aplicar la metodología a otras enfermedades diferentes a la malaria.

En conjunto este trabajo valida la importancia del UPS dentro de la biología de *P. falciparum*, identificando algunas proteínas que podrían convertirse en nuevas dianas antimaláricas. Además, los métodos descritos poseen numerosas aplicaciones en el estudio de la malaria, pero también en otras enfermedades en las cuales el UPS está implicado.

SUMMARY

Malaria is one of the deadliest infectious diseases in the world. Majority of the cases occur in Africa, Asia and parts of South America, impacting economic development in many impoverished countries. The most severe form of malaria is produced by the infection of the protozoan parasite *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). *P. falciparum* has a complex multistage life cycle. The intraerythrocytic stage is associated with pathogenesis, being the primary target for antimalarials. Spreading resistance to current treatments urges the need for new drugs with new modes of action and identification and validation of novel drug targets.

The ubiquitin proteasome system (UPS) is one of the few chemically validated pathways for *P. falciparum*. Human proteasome inhibitors can efficiently inhibit *P. falciparum*-resistant strains at various stages of the cycle. Several compounds targeting the human UPS have entered clinical phases, validating this pathway for cancer treatment. Inhibitors targeting specifically different components of the parasite UPS are desirable to reduce possible side effects. Despite of that, little is known about this system in the parasite, hindering the drug development.

The UPS is regulated by several post-translational modification and controls many essential cellular processes such as cell cycle, apoptosis, DNA repair, protein trafficking, etc. Moreover, this system has been frequently associated with host-pathogen interactions since it is implicated in antigen processing and host immune system bypass. *P. falciparum* modifies the host proteome by completely transforming the erythrocytes into a niche where it can grow but the mechanisms used to achieve that are presently unknown.

To fully expand our understanding of the UPS in the host-pathogen interactions in malaria, and the processes regulated by this system, ubiquitylated proteins as well as interacting factors from both *P. falciparum* and the erythrocyte, were characterized along the intraerythrocytic infection. For this purpose two methodologies were established.

Firstly, a method to obtain cultures at high parasitaemia was established to enrich infected erythrocytes and reduce the interference coming from the

uninfected erythrocytes in the mass spectrometry (MS) analysis, which is described in CHAPTER 1. This method combines percoll and sorbitol synchronization, purification with magnetic columns and a reduction in the haematocrit to increase the *P. falciparum* invasion ratio. It is an easy, fast and reproducible method that allows achieving parasitaemias around 40%. It could be applied in other parasitological studies in which synchrony and/or high parasitaemia are required.

The enrichment of ubiquitylated proteins from those cultures for MS identification is hampered by their inherent instability, stemming from both proteasomal degradation and de-conjugation by de-ubiquitinating enzymes (DUBs). Thus, tandem ubiquitin-binding entities (TUBEs) crosslinked to agarose beads, were used to develop a method that allowed the pull down of ubiquitylated proteins while preserving the physiological conditions of the samples. It required multiple optimizations to reduce the interference coming from the haemoglobin and increase the number of ubiquitylated proteins identified. Steps are listed in CHAPTER 2.

Ubiquitylated proteins from uninfected erythrocytes, as well as rings, trophozoites and schizonts infected erythrocytes were purified using the methods previously established and analyzed by MS in CHAPTER 2. As a result, 1237 proteins (683 human and 554 parasite) were identified, some of them containing ubiquitylation signatures (gly-gly peptides). A statistic enrichment filter was applied to select the most represented proteins from the host or parasite in our analysis. These proteins were considered as TUBEs enriched and were further analyzed using bioinformatic tools as gene ontology (GO) and ingenuity pathway analysis (IPA) software. Some results were then confirmed by Western blot assays with specific antibodies.

Most of the TUBEs enriched proteins were from the UPS. Parasite ubiquitylated proteins increased along the infection having a peak in the schizont stage, while the host ubiquitylated proteins increased after infection (rings) but then decreased with the parasite life cycle. This crosstalk between the UPS of both organisms, suggests that the parasite infection leads to a down regulation of the proteolytic functions of its host to better survive in the host environment.

In addition to the UPS, after infection there were significant changes in the erythrocyte pathways “protein folding”, “endocytosis mediated by clathrin” and “oxidative stress response mediated by NRF2” in the trophozoite stage. Erythrocytic chaperons and TriC components also changed, which have been shown to be manipulated in other cells for different pathogens.

Regarding to *P. falciparum*, pathways “DNA replication” in the schizont stage, “oxidative stress response mediated by NRF2” and “protein transport and *Maurer's cleft system*” in the trophozoite stage, showed the most significant changes. Results revealed a strong regulation of the parasite's DNA replication machinery suggesting the putative ubiquitylation of a group of *P. falciparum* MCMs (Mini-chromosome maintenance Proteins) at schizont stage. The involvement of the UPS in the *Maurer's cleft* secretion system, the *Knobs* adherence structures formation, and the erythrocyte remodeling was one of the most important finding of this work. The ubiquitylation of REX1, a protein located in *Maurer's cleft* and important for parasite nutrient import, was confirmed. Ubiquitylation signatures and high molecular weight forms were found in Western blot assays, peaking in the trophozoite stage. This study could help to provide a new drug target belonging to the UPS, but essentiality and chemical validation will be required.

Another approach used in this work to identify new drugs acting through the parasite UPS and/or new drug targets chemically validated is described in CHAPTER 3. Two cellular and high-throughput (HTS) assays based on TUBEs were developed to quantify the total pool of ubiquitylated proteins in *P. falciparum* cell lysates, detecting changes in their levels in presence of UPS inhibitors. Both assays allow identifying inhibitors of any component of the UPS that change the levels of ubiquitylated proteins, without requiring knowledge, a previous validation or protein expression.

The first assay developed was a homogeneous assay in 1536 well plate format and based on the AlphaLISA technology. It can be used as a primary test to perform HTS campaigns, to identify molecules that alter the levels of ubiquitylated proteins. The second technique is a heterogeneous dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay (DELFI), established in 384 well plate format, that can be useful to confirm the positive compounds found in the primary assay, and hence

discard false-positive compounds associated with AlphaLISA technology. This heterogeneous assay requires washing steps, thus increasing the time of manipulation and results deviation. However, the advantage is the reduction of background interference by compounds and biological components of the assay. The suitability of the assays to perform HTS campaigns was validated using known proteasome inhibitors (CHAPTER 3).

Both assays could be useful to identify new chemical scaffolds that act in some component of the UPS in a screening campaign, and also for identifying new druggable targets after target deconvolution of those compounds. Moreover, they could be also adapted to identify the ubiquitylation levels of specific proteins changing the primary antibody, for example proteins detected in CHAPTER 2, or to study other diseases different to malaria.

Overall this work validates the importance of ubiquitylation within the *P. falciparum* biology, and highlights some proteins that could be validated as antimalarial drug targets in further studies. Moreover, the establishment of all the methods described, have numerous applications not only in malaria but also in different diseases where the UPS plays an important role.

2. Introducción

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA MALARIA COMO ENFERMEDAD

2.1.1. Generalidades, manifestaciones clínicas e impacto de la malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por la infección de una de las cinco especies de *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Es transmitida a través de la picadura de distintas especies de la hembra de mosquitos *Anopheles*, lo que contribuye a los diversos patrones epidemiológicos de la enfermedad en el planeta. En raras ocasiones, la transmisión es posible entre humanos, solo a través de trasplantes de órganos, transfusiones sanguíneas y por vía placentaria de la madre al feto.

Los síntomas aparecen entre 9 y 40 días después de la infección, dependiendo de la especie de *Plasmodium* implicada, siendo *P. falciparum* la especie con el periodo de incubación más corto (9-14 días). Los síntomas de los 2-3 primeros días son similares a los producidos por bacterias, virus como la gripe, u otros parásitos, ya que incluyen fiebre, escalofríos y sudores, dolores de cabeza y musculares, fatiga, tos, nauseas y vómitos, lo que dificulta en ocasiones su diagnóstico. Sin embargo, tras una semana de infección aparecen cuadros de fiebres periódicas relacionados con el ciclo de vida del parásito. Dichos ciclos varían dependiendo de la especie infectiva siendo de 48-50 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum*, y de 72 horas en *P. malariae* (Hausmann, 2003; Warrell, 2002). Su intensidad y recuperación depende de la especie y la carga infectiva, pero también del estado de salud del propio individuo. La enfermedad puede ir desde una malaria leve que remite sin tratamiento, como en el caso de infecciones por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, hasta una malaria severa que produce la muerte del individuo (Miller et al., 2002). *P. falciparum* es la especie que da lugar a la mayoría de los casos de malaria severa (Schofield and Grau, 2005; Baird, 2005), siendo además la causante de la mayoría de las infecciones en África (Figura I.1). Puede llevar a daños en el sistema nervioso central con pérdida de conciencia,

anemia severa, fallo renal, colapso circulatorio, ictericia, hiperlactacidemia e insuficiencia respiratoria (Schofield and Grau, 2005).

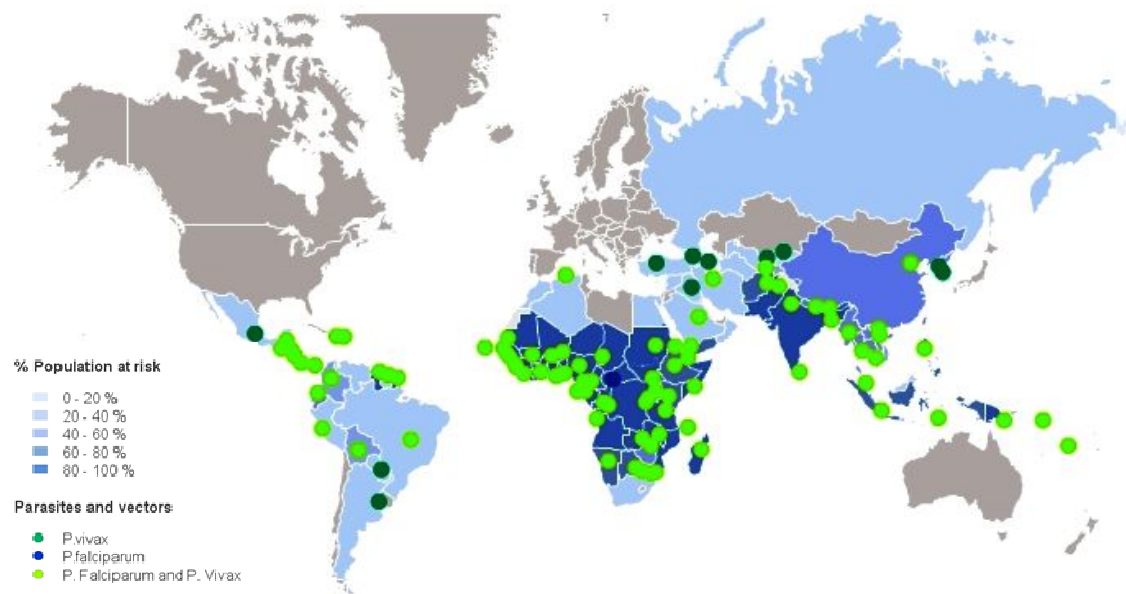


Figura I. 1. Población en riesgo de sufrir Malaria en 2014. Fuente: WHO, 2014

Aunque la malaria es una enfermedad tratable, actualmente está considerada como la enfermedad parasitaria más importante del planeta. Según la WHO (WHO, 2015b) en 2015 se diagnosticaron alrededor de 214 millones de casos clínicos, de los cuales murieron alrededor de 438.000 personas. Las cifras reales podrían incluso ser mayores debido a los efectos indirectos que produce la nutrición y otras infecciones como el VIH en la enfermedad (Snow et al., 2005). La malaria supone un alto riesgo para mujeres embarazadas, pudiendo causar graves problemas al feto, y tiene una gran prevalencia en niños. Se estima que uno de cada 20 niños menores de 5 años muere a causa de la enfermedad. A pesar de que el 90% de los casos tienen lugar en África (Bell et al., 2006; Breman et al., 2004; WHO, 2015b), es un problema de salud pública mundial ya que está presente en más de 100 países habitados con 2400 millones de personas. La malaria se encuentra en Centroamérica, Sudamérica, Haití, Jamaica y República dominicana, en gran parte del continente asiático, en Europa del este y en el Pacífico sur (Figura I.1). El aumento de los viajes a áreas endémicas hace que esté presente en otros

lugares como Reino Unido, donde en 2014 se diagnosticaron entre 1500-2000 casos nuevos (WHO, 2014; Review-Malaria, 2016). Esto hace que la malaria suponga un alto impacto socio-económico (Sadanand, 2010). Tanto es así que se ha estimado que el incremento del producto nacional bruto incrementa un 2% menos en países donde la malaria es endémica (Chima et al., 2003; Sachs and Malaney, 2002). Solo en África la enfermedad supone alrededor de 12 billones de dólares al año, lo que a su vez dificulta la erradicación de la enfermedad en éstos países (Sachs and Malaney, 2002).

2.1.2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

Los parásitos del género *Plasmodium* son protistas pertenecientes al *subphylum Apicomplexa*, que reciben el nombre por el complejo apical que caracteriza a las fases infectivas (merozoitos). Dicho complejo está formado por varias estructuras como el conoide, las roptrias, el anillo polar y en ocasiones micronemas, que con ayuda de las secreciones de los gránulos densos que rodean al complejo, permiten la entrada del parásito a la célula hospedadora (Hausmann, 2003). Algunos *Apicomplexa* como *Plasmodium* poseen también un orgánulo característico, el apicoplasto (Fleige et al., 2010). Dicha estructura es un orgánulo no fotosintético, que posee cuatro membranas y que pudo ser resultado de una endosimbiosis secundaria (Hopkins et al., 1999; Waller et al., 2000), en la que una célula que contenía un cloroplasto fue engullida por una célula heterótrofa.

Estos protozoos *Plasmodium* presentan un ciclo de vida complejo (Figura 1.2), adoptando diferentes formas a lo largo de su ciclo vital en los dos hospedadores que parasita, el mosquito que es el hospedador definitivo, donde se produce la reproducción sexual, y el hospedador intermediario, que puede ser un mamífero o un ave y es donde tiene lugar la reproducción asexual (Sleigh, 1979; Warrell, 2002). Debido a su complejo ciclo de vida, el parásito necesita de una continua interconexión con el hospedador para su supervivencia.

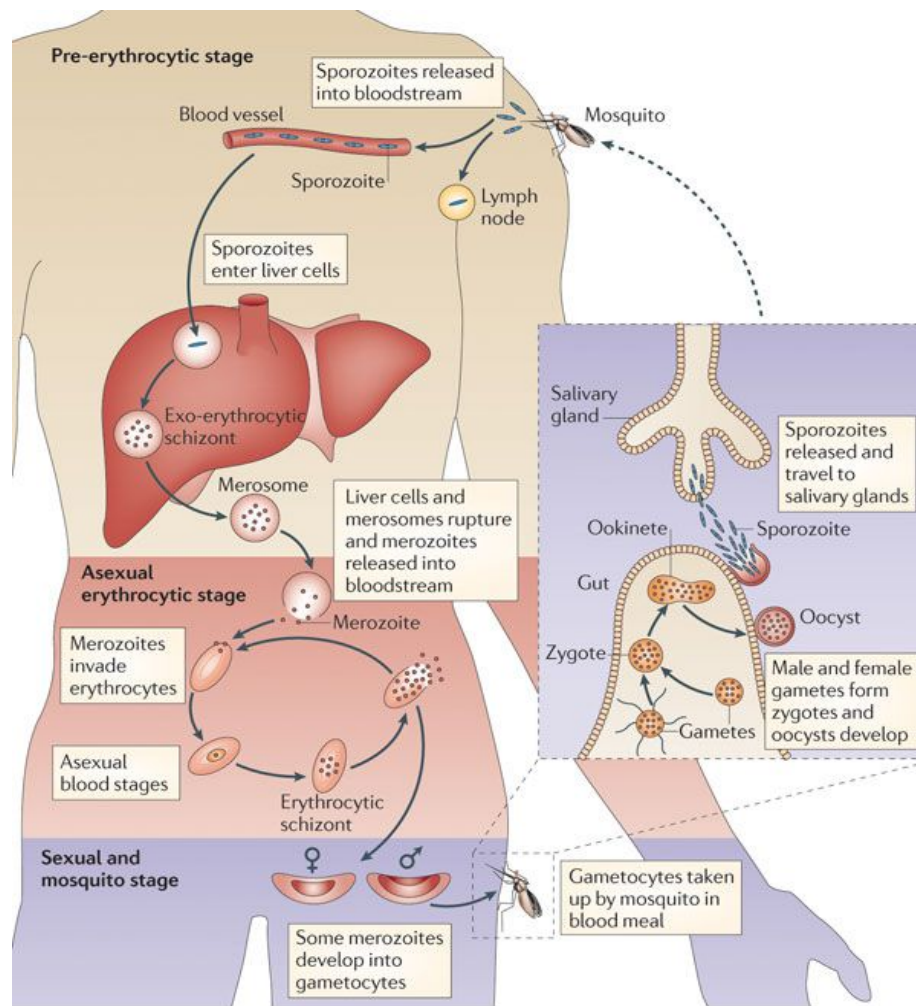


Figura I. 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. El mosquito *Anopheles* al alimentarse de sangre inocula esporozoitos en el torrente sanguíneo que estaban localizados en sus glándulas salivares. Los esporozoitos se dirigen al hígado invadiendo los hepatocitos, donde dan lugar a esquizontes. Al romperse el esquizonte se liberan merozoitos a la sangre. Los merozoitos invaden los glóbulos rojos dando lugar a la fase intraeritrocítica de anillo. El anillo se transforma en trofozoito y este a su vez en esquizonte. Los esquizontes se rompen liberando de nuevo merozoitos al torrente sanguíneo, donde invaden nuevos eritrocitos o maduran a gametocitos. Cuando otro mosquito toma sangre incorpora los gametocitos, que maduran a macrogametos y microgametos en su estómago, produciéndose la fecundación. Tras la fecundación se produce un oocineto que al atravesar la pared del estómago forma el oocisto. El oocisto libera esporozoitos que viajan a las glándulas salivares comenzando un nuevo ciclo. Fuente: *Sauerwein et al, 2011*

Las infecciones por las especies de *Plasmodium* causantes de la malaria, comienzan con la entrada de entre 15-123 esporozoitos tras la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* previamente infectado. Una vez inoculados en la sangre, estas formas parasitarias fusiliformes se dirigen a través del torrente sanguíneo hacia el hígado, donde infecta a hepatocitos a través de una

invaginación. Esto da lugar a la vacuola parasitófora que lo rodea y separa del citoplasma del hepatocito (Prudencio et al., 2006). Es allí donde de forma silente tiene lugar el ciclo exoeritrocítico, dividiéndose miles de veces y dando lugar a una nueva forma parasitaria, el esquizonte. El esquizonte contiene entre 10000 y 50000 nuevos parásitos haploides llamados merozoitos (Good, 2005; Oaks, 1991; Warrell, 2002). Tras 5-15 días, dependiendo de la especie, los hepatocitos se rompen liberando los merosomas que contienen a los merozoitos. En algunos *Plasmodium* como *ovale* o *vivax*, estas formas hepáticas pueden persistir permaneciendo latentes, pudiendo llevar a recaídas tras semanas o meses después de la infección. Una vez en el torrente sanguíneo, tras pasar por los capilares pulmonares, los merozoitos son liberados e invaden glóbulos rojos presentes en la sangre (Baer et al., 2007) (Figura I.2, Figura 3.1A, Figura 4.1A).

Así comienza la llamada etapa intraeritrocítica, la cuál es la responsable de los síntomas de la malaria. Durante esta etapa el parásito es capaz de alimentarse, replicarse y escapar del sistema inmune del hospedador. Tras su entrada, el parásito remodela el eritrocito completamente, modificando su permeabilidad, sus características de adhesión y estableciendo un completo sistema de transporte para adquirir los nutrientes desde el eritrocito y exportar sus propias proteínas. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el parásito da lugar a todos estos cambios aún no han sido completamente elucidados. En cuanto a la duración de la etapa intraeritrocítica depende de las especies, siendo de 48-50 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y de 72 horas en *P. malariae*. Durante la invasión tienen lugar una serie de procesos. En primer lugar se produce la interacción entre el merozoito y el eritrocito, mediante el reconocimiento de proteínas de superficie de ambos, parásito y hospedador. Tras esto, el merozoito se reorienta con su complejo apical hacia la membrana del eritrocito y forma una unión estrecha entre ambos, que le permite su entrada al interior del eritrocito. Este proceso coincide con la secreción de lípidos y proteínas a la membrana del eritrocito, provenientes de las roptrias, micronemas y mononemas del parásito, induciendo así la invaginación y la formación de la vacuola parasitófora en el interior del eritrocito (Cowman and Crabb, 2006; Maier et al., 2009; Silvie et al., 2008; Warrell, 2002). Una vez allí el parásito pasa por tres fases diferenciadas, el anillo, el trofozoito y el esquizonte

(Figura 3.1A, Figura 4.1A). El anillo es la forma vacuolada que se observa inmediatamente después de la invasión del merozoito. Esta forma perdura aproximadamente 24 horas, durante las cuales el parásito crece hasta transformarse en el trofozoito.

El trofozoito posee una alta actividad metabólica y biosintética que está altamente entrelazada con la del huésped (Lang-Unnasch and Murphy, 1998). La mayoría de los genes del parásito son expresados en la etapa intraeritrocítica, estando altamente regulados. El 75% de los genes tan solo son activados una vez a lo largo del ciclo intraeritrocítico, coincidiendo con la etapa donde su función es requerida (Bozdech et al., 2003). Esto conlleva además, un alto recambio de proteínas (Bautista et al., 2014). Para dicha síntesis de proteínas, el parásito obtiene aminoácidos directamente del citoplasma del eritrocito, mediante síntesis *de novo*, o a través de la degradación de la hemoglobina del eritrocito, siendo esta última la fuente mayoritaria. El parásito incorpora en la vacuola digestiva el 65% de la hemoglobina total del eritrocito (Krugliak et al., 2002). Sin embargo, tras digerirla se generan una serie de productos derivados del grupo hemo, como la α -hematina (hemoprotoporfirina α), que son tóxicos por su poder oxidante. Para evitar su toxicidad el parásito polimeriza la α -hematina, dando lugar a la hemozoina. Dicho pigmento es inerte y es característico observarlo al microscopio en la etapa de trofozoito (Frosch et al., 2007; Warrell, 2002).

Gracias a la gran actividad metabólica que tiene lugar, los trofozoitos incrementan su tamaño hasta ocupar un tercio del citoplasma del eritrocito (Saliba and Kirk, 1998), formándose el esquizonte tras 36 horas de la invasión. En esta etapa, el núcleo del parásito se divide asexualmente (esquizogonia) dando lugar a entre 6 y 32 nuevos merozoitos (Sleigh, 1979; Warrell, 2002). Dichos merozoitos se liberan a las 48 horas tras romper el eritrocito, e invaden nuevos glóbulos rojos cerrando así el ciclo intraeritrocítico (Figura I.2, Figura 3.1A, Figura 4.1A). La ruptura del eritrocito es la responsable de los síntomas característicos de la enfermedad. La liberación al torrente sanguíneo de cuerpos residuales y detritus celulares, llevan a inducir citoquinas en el hospedador que producen las fiebres. Estas fiebres son periódicas coincidiendo con la duración del ciclo intraeritrocítico, ya que las esquizogonias del parásito terminan por sincronizarse (Kwiatkowski et

al., 1990; Chen et al., 2000). Una ruptura masiva de los eritrocitos puede llevar a producir una anemia severa (Schofield and Grais, 2005).

Sin embargo, no todos los parásitos invaden eritrocitos para llevar a cabo el ciclo asexual. Una pequeña parte no invade, dando lugar a formas sexuales femeninas o masculinas, los gametocitos (Figura I.2). Tras la picadura de un mosquito *Anopheles* los gametocitos son ingeridos. Una vez en el estomago del mosquito, el cambio en la temperatura y pH, junto con la presencia de ácido xanturénico, lleva a la maduración de los gametos (Hausmann, 2003; Oaks, 1991; Warrell, 2002). El gametocito femenino da lugar a un macrogameto, mientras que el masculino tras tres divisiones mitóticas forma microgametos flagelados, que viajan a través de la sangre ingerida para encontrar un macrogameto, produciéndose la fecundación (Ramasamy et al., 1997). El cigoto diploide formado en el estómago se divide por meiosis, formando tras 12- 48 horas el ooquinetto, una forma móvil que es capaz de atravesar la pared del estómago hasta la lámina basal. Una vez allí segrega una cubierta ooquistica formando el oocisto. El desarrollo del oocisto lleva aproximadamente 10-12 días. Tras su formación, éste crece adquiriendo nutrientes de la hemolinfa a través de la lámina basal, produciéndose una serie de divisiones mitóticas conocidas como esporogonia. Como resultado de este proceso se producen miles de esporozoitos, que finalmente se liberan debido a su acumulación. Los esporozoitos liberados al hemocele del mosquito, son llevados a través de la circulación de la hemolinfa a todos los tejidos. Sin embargo algunos de ellos pasan a las glándulas salivares del mosquito, donde se adhieren a la lámina basal invadiéndola. Así el ciclo vuelve a comenzar cuando los esporozoitos se inyectan al hospedador vertebrado, a través de la picadura del mosquito (Aly et al., 2009) (Figura I.2).

La elucidación del ciclo vital de *Plasmodium*, así como el estudio de su biología y patogénesis, ha sido posible gracias al establecimiento de una serie de herramientas y métodos para el trabajo *in vitro*. El establecimiento de métodos para cultivar de forma continua el parásito es esencial para el descubrimiento de nuevos fármacos y vacunas. Por ello, se han invertido grandes esfuerzos en el cultivo continuo de *P. falciparum*, concretamente en su etapa intraeritrocítica.

2.1.3. Historia de la malaria y sus tratamientos

La Malaria ha convivido con el hombre a lo largo de la historia de la humanidad, influyendo en el poder de reinos y el estado económico de las naciones. Aunque su origen continua siendo hoy en día ampliamente debatido, varios estudios apuntan a que ésta apareció en África, concretamente en las regiones de Etiopía, habiendo pasado del chimpancé a nuestros antepasados homínidos (Schlagenhauf, 2004; Rich et al., 2009). Se cree que la malaria se extendió debido a la emigración humana a través del continente Africano por el valle del Nilo y el mediterráneo, hacia Asia y Europa, y que finalmente llegó a América con la colonización. Las primeras referencias históricas a los síntomas de la enfermedad se encontraron en documentos de la antigua china datados en el 2700 a.c., y más tarde en tablas de arcilla mesopotámicas del año 2000 a.c. Parece ser que egipcios, hindús y griegos también sufrieron de dicha enfermedad al encontrarse textos que le hacen referencia (Cox, 2010). Los antiguos griegos observaron que la enfermedad se daba mayoritariamente en personas que vivían cerca de zonas pantanosas. Durante alrededor de 2500 años se creyó que las fiebres de malaria eran causadas por miasmas, emanación nociva que se suponía desprendían los cuerpos enfermos o materias en descomposición. De ahí que fuese denominada como "malaria" del italiano "mal aria", cuyo significado es "mal aire". No fue hasta el año 1880 cuando Charles Louis Alphonse Laveran, doctor en la armada francesa, observó por primera vez el parásito de la malaria en los eritrocitos humanos. La implicación de la hembra del mosquito *Anopheles* como vector de transmisión entre humanos, fue descrita más tarde en el año 1899 por Ronald Ross, y confirmada en paralelo gracias a un grupo de científicos italianos (Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi and Ettore Marchiafava) (Schlagenhauf, 2004; Rich et al., 2009).

Hasta el siglo XVII el tratamiento de la malaria estaba basado principalmente en el sangrado y las purgas de los pacientes, aunque había otros métodos menos ortodoxos como ajo en vinagre, bebidas con pepino y alcanfor o incluso amuletos de grandes dientes de pez para las fiebres (Moore, 1886). Fue el descubrimiento en Perú de la corteza del árbol de la *chinchona*, también llamado de la Quina o

Quinina, lo que revolucionó el tratamiento de la malaria. Aunque hay controversias respecto a si los lugareños conocían las propiedades de la corteza antes de la colonización, lo que se sabe con certeza es que fueron los misioneros jesuitas los que la introdujeron en Europa para el tratamiento de la malaria (Schlagenhauf, 2004).

Durante siglos se utilizó la corteza de la *chinchona* de múltiples modos para la profilaxis y tratamiento de la malaria, cultivándose grandes plantaciones de dicho árbol, aunque no fue hasta el año 1820 cuando se extrajo por primera vez el principio activo, la Quinina (Figura I.3). Ésta fue de vital importancia en colonizaciones, exploraciones y campañas militares, especialmente en la primera guerra mundial donde los soldados morían más por fiebres que por balas. La gran demanda de Quinina llevó a la síntesis química de antimaláricos por parte de las farmacéuticas. En 1934 el Alemán Hans Andersag sintetizó por primera vez la Cloroquina en los laboratorios Bayer, aunque no se comercializó hasta el año 1947 (Schlagenhauf, 2004). La Cloroquina es un derivado sintético de la Quinina, que posee una vida media de eliminación larga de alrededor de 60 días. Tras la Cloroquina, otros compuestos similares con diferentes tiempos de vida media como la Mefloquina, Amodiaquina, Piperaquina, Primaquina y Lumefantrina fueron sintetizados (Figura I.3). Aunque el mecanismo de acción de la Cloroquina aún no ha sido elucidado, se piensa que el mecanismo principal es a través de la vía de detoxificación del grupo hemo, concretamente impidiendo la conversión del grupo hemo, tóxico para el parásito, en hemozoina (Fitch, 2004).

La larga vida media de la Cloroquina le confiere el efecto de quimioprofiláctico, pero debido al largo periodo de exposición a la que los parásitos están expuestos, también ha llevado a la selección de parásitos resistentes (Figura I.4) (Wellems and Plowe, 2001). A finales de los años 50, aparecieron los primeros parásitos resistentes en Brasil y el sudeste asiático (Camboya). En los años 70, dicha resistencia ya se había propagado por África, siendo hoy en día los parásitos *P. falciparum* resistentes a Cloroquina los predominantes en las áreas endémicas. Esta resistencia se ha asociado con cambios en varios transportadores. El *PfMDR1*, un transportador de fármacos localizado en la membrana de la vacuola digestiva, el *PfCRT* también un transportador de fármacos y metabolitos de la vacuola digestiva,

y el *PfMRP1*, un transportador de la familia de los transportadores ABC (Cui et al., 2015).

Como respuesta a la aparición de cepas resistentes a la Cloroquina, tras las quinolinas surgieron otros antimaláricos como los antifolatos Sulfadoxina, Pirimetamina y Proguanil (Figura I.3). Todos ellos inhiben la síntesis del ácido fólico, pero a través de la inhibición de diferentes enzimas. La Sulfadoxina inhibe la Dihidropteroato sintetasa (*PfDHPS*), mientras que la Pirimetamina y el cicloguanil, un metabolito del Proguanil, actúan a través de la Dihidrofolato reductasa (*PfDHFR*) (Petersen et al., 2011). Estos fármacos comenzaron administrándose en combinación, resultando ser muy efectivos y baratos, pero pronto aparecieron mutaciones puntuales en las enzimas diana que dieron lugar a resistencias (Paget-McNicol and Saul, 2001) (Figura I.4). A pesar de ello, actualmente el Proguanil continúa utilizándose en combinación con la Atovaquona (malarone), como profilaxis y tratamiento para los turistas que viajan a zonas endémicas (Petersen et al., 2011).

La Atovaquona (Figura I.3) es un antimalárico utilizado como tratamiento frente a diferentes parásitos apicomplexa (Srivastava et al., 1997). Es un análogo estructural del ubiquinol, el cual es una coenzima básica de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Su diana principal es el complejo del Citocromo bc1 de la membrana mitocondrial interna, afectando a la cadena respiratoria. De nuevo la aparición de mutaciones en el gen del Citocromo bc1 ha llevado a la aparición de resistencias (Figura I.4) (Gil et al., 2003).

La generación de resistentes frente a todos estos fármacos, provocó que a partir de los años 70 la Artemisinina y derivados reemplazasen a los tratamientos utilizados hasta el momento (Figura I.3) (Eastman and Fidock, 2009). La Artemisinina es un producto natural aislado de la planta *Artemisia annua* (ajeno chino), que se venía utilizando durante siglos como remedio natural en la medicina tradicional china. Ésta produce la muerte del parásito más rápido que otros antimaláricos, incluso en la etapa de gametocito, lo cual podría tener la ventaja de además disminuir la transmisión (Hyde, 2002). Debido a la baja solubilidad de la Artemisinina, en la clínica se han utilizado varios derivados sintéticos como el

Artemeter, Artesunato y la Dihidroartemisinina (DHA) (Figura I.3), metabolito activo de la Artemisinina.

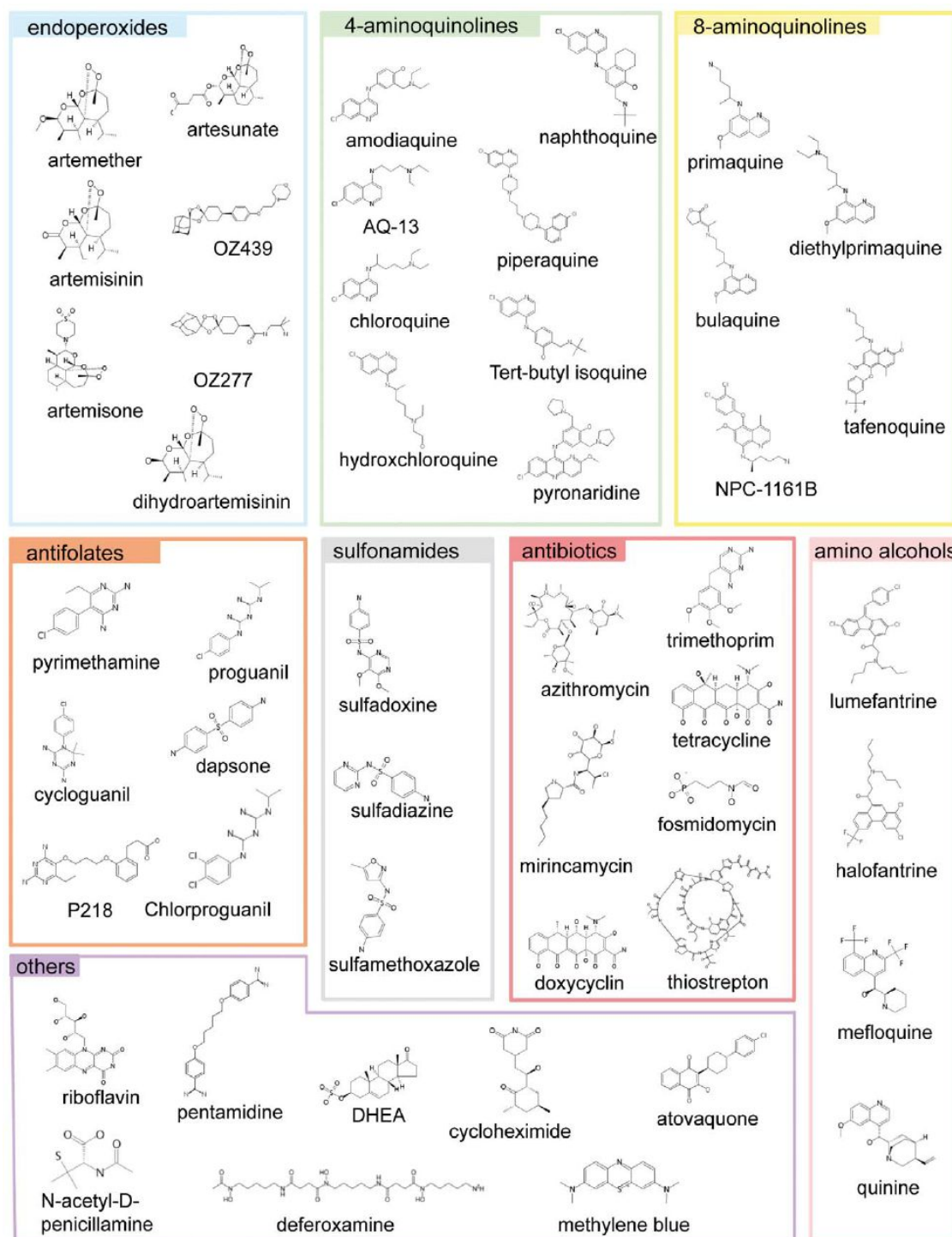


Figura I. 3. Estructuras químicas de las principales clases de antimaláricos. Antimaláricos clasificados según su estructura (endoperoxidos y aminoalcoholes), en base a su función (antifolatos y antibióticos) o ambas. Fuente: *Delves et al., 2012*

Aunque el mecanismo de acción de las Artemisininas no está totalmente claro, parece ser que el endoperóxido que posee podría dar lugar en la célula a la formación de radicales reactivos de carbono, alquilando diferentes biomoléculas esenciales como los lípidos celulares y las membranas de la vacuola digestiva (Bray et al., 2005), llevando a la muerte del parásito. El Fe^{2+} presente en el grupo hemo, liberado tras la degradación de la hemoglobina, podría ser el causante de la activación de la artemisinina (Klonis et al., 2011; Miller et al., 2013).

Al igual que sucedió con otros antimaláricos, recientemente se ha reportado la aparición de cepas resistentes a Artemisinina y derivados en el sudeste asiático, concretamente en la frontera de Camboya con Tailandia (Cui et al., 2015). Esta resistencia parece estar asociada a mutaciones en el gen de la proteína KELCH13. La introducción de mutaciones en el gen KELCH13 incrementa la supervivencia frente a la Dihidroartemisinina, confirmando así el papel de la mutación en la resistencia (Straimer et al., 2015). En otros organismos estas proteínas actúan como adaptadoras para la E3 ubiquitina ligasa Cullina 3, relacionada con la vía antioxidante NRF2. Polimorfismos en la Des-ubiquitinasa (DUB) UBP1, también se han asociado con la resistencia a Artesunato en *P. chabaudi*, el parásito que produce malaria en roedores (Hunt et al., 2007). Además de esto, aunque parece que la amplificación del gen *PfMDR1* y mutaciones en el transportador de calcio ATPasa 6 (*PfATP6*) no median completamente la resistencia, reducen la susceptibilidad del parásito frente a estos fármacos (Chavchich et al., 2010; Jambou et al., 2005).

A pesar de la gran efectividad de las Artemisininas, debido a su corta vida media y a la reciente aparición de resistencias, actualmente se recomienda su uso en combinación con otros antimaláricos. Estas terapias de combinación son las llamadas ACTs (Artemisinin-based Combination Therapies). La ACT más utilizada en Asia y África es Artemeter–Lumefantrina, aunque otras combinaciones como Artesunato–Mefloquina, Artesunato–Amodiaquina, Artesunato–Sulfadoxina–Pirimetamina, Dihidroartemisinina–Piperaquina y Artesunato–Pironaridina también son empleadas (Eastman and Fidock, 2009). A pesar de que las combinaciones con derivados de Artemisinina son los tratamientos de primera línea recomendados por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2015a), otras

combinaciones no ACTs continúan siendo administradas. Por ejemplo, como tratamiento a la malaria provocada por otras especies de *Plasmodium* diferentes a *falciparum*, en embarazadas, como profilaxis, o para tratar la malaria no complicada (Gamo, 2014).

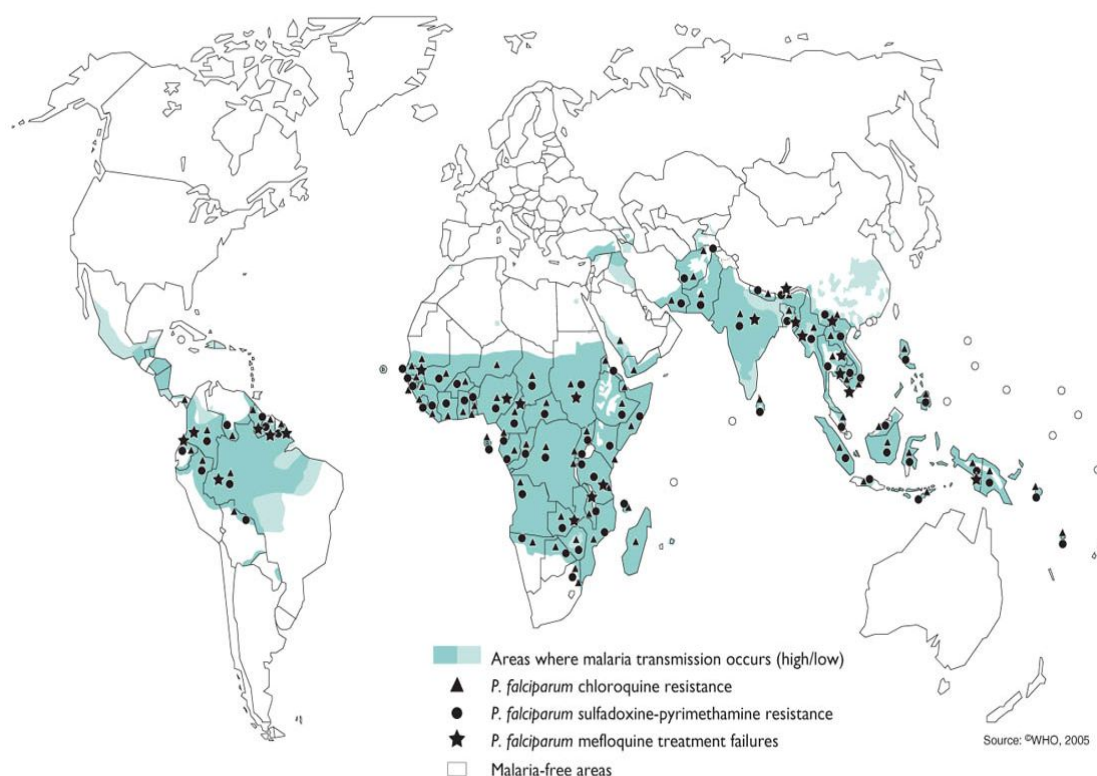


Figura I. 4. Mapa de resistencias frente a antimaláricos. Fuente: WHO, 2005

2.1.4. Impacto y estrategias actuales para el control de la malaria

A principio del siglo XX la malaria se transmitía a lo largo del planeta (Figura I.5), teniendo una gran influencia en la economía mundial. Por ello, tras la segunda guerra mundial se hicieron grandes esfuerzos para acabar con la malaria. Durante décadas, la Organización Mundial de la Salud y la comunidad internacional, han llevado a cabo campañas de erradicación, combinando el uso de antimaláricos con insecticidas como el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), para así acabar con los mosquitos *Anopheles* y por tanto con la transmisión de la enfermedad. Dichas campañas surgieron efecto en muchas áreas geográficas, pero no en África tropical

y parte del continente asiático (Figura I.5). Ello se debe fundamentalmente a la aparición de resistencias frente a casi todos los antimaláricos conocidos (White et al., 2004; Daily, 2006) e insecticidas (Greenwood et al., 2008), pero también a la presencia de otras enfermedades como el VIH, que aumentan la susceptibilidad de sufrir malaria, al calentamiento global, que incrementa la transmisión en determinadas áreas, y a problemas políticos que impiden un tratamiento efectivo, favoreciendo el hacinamiento y la transmisión de la enfermedad. Esto, junto con la falta de una vacuna eficaz, debido al complejo ciclo de vida del parásito y a sus mecanismos de evasión inmunológica (Scherf et al., 2008), han dificultado en gran manera el control de la enfermedad, favoreciendo su reaparición en áreas donde ya había sido erradicada (Bremán et al., 2006).

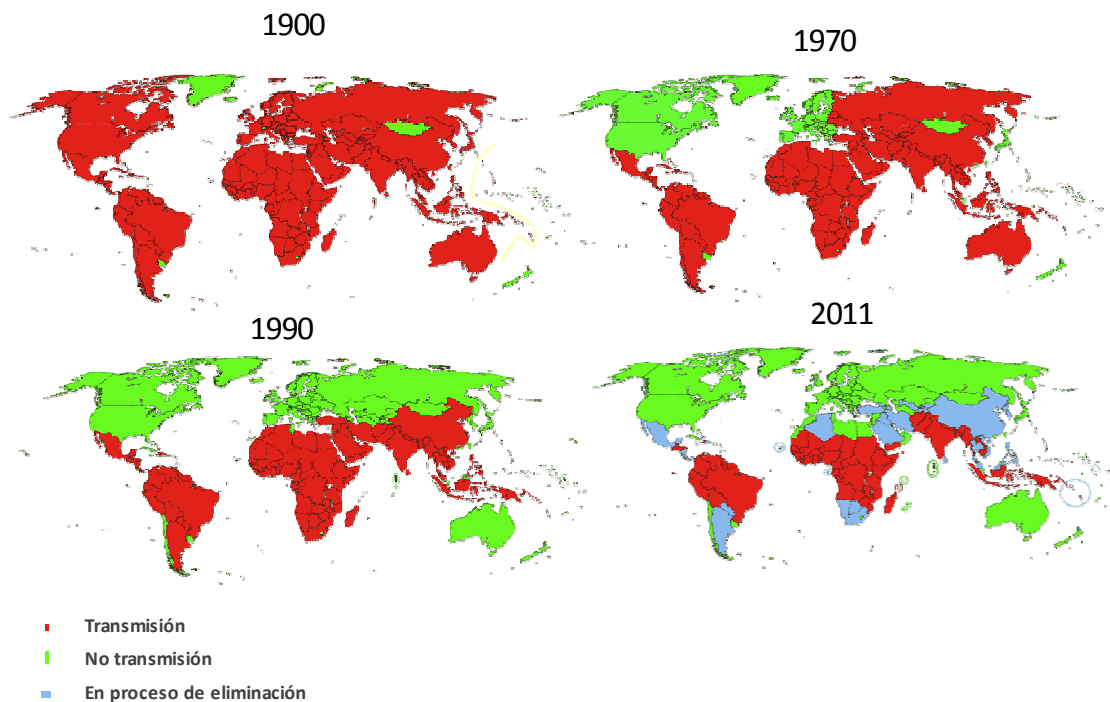


Figura I. 5. Transmisión de la malaria en el siglo XX. Fuente: *Malaria Elimination initiative 2011 USCF Global Health Group.*

Por ello, actualmente se están llevando a cabo varias estrategias para eliminar y prevenir la malaria desde diferentes campos. Dichas estrategias se basan principalmente en el control del vector, en el desarrollo de vacunas y en el desarrollo de nuevos antimaláricos. La primera estrategia se basa en limitar la exposición al parásito, al reducir la población de mosquitos en las zonas

endémicas. Por ejemplo, utilizando insecticidas localmente e impregnando mosquiteras con éstos (Okumu and Moore, 2011). Esto ha ayudado a que entre los años 2000 y 2015 la incidencia de la malaria se redujera alrededor de un 40%, disminuyendo en un 60% las muertes producidas por dicha enfermedad (WHO, 2015b).

En cuanto al desarrollo de vacunas, actualmente varias vacunas se encuentran en diferentes ensayos clínicos, aunque no poseen un 100% de eficacia. Estas vacunas actúan principalmente en las etapas de esporozoito y merozoito, donde el parásito está momentáneamente fuera de los hepatocitos o eritrocitos (Targett and Greenwood, 2008; Schwenk and Richie, 2011). Por ello, el tratamiento con antimaláricos continúa siendo el componente dominante en el control de la malaria. La aparición de resistencias frente a los antimaláricos conocidos hasta el momento, hace imprescindible el desarrollo de nuevos compuestos antimaláricos con estructuras y mecanismos de acción novedosos, lo que requiere a su vez el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Un buen antimalárico debe no solo matar al parásito, sino también ser activo frente a cepas resistentes a los actuales tratamientos, ser lo suficientemente seguro y además tener un reducido coste de producción.

Actualmente se están llevando a cabo dos aproximaciones para el descubrimiento de nuevos antimaláricos, la aproximación con ensayos fenotípicos y la aproximación con ensayos basados en diana. Los ensayos fenotípicos basados en célula entera, consisten en testar los compuestos directamente en eritrocitos infectados con el parásito y ver la inhibición de su crecimiento. Una de las campañas de cribado de alto rendimiento (HTS), basadas en célula entera fue llevada a cabo en GlaxoSmithKline (Gamo et al., 2010), encontrándose 13500 compuestos que inhibían el crecimiento intraeritrocítico de *P. falciparum* y dando lugar a lo que se llamó el Tres Cantos Antimalarial Set (TCAM set), la mayoría activos frente a cepas multiresistentes.

Sin embargo, el hecho de que el modo de acción de estas moléculas sea desconocido, hace dificultosa la priorización, modificación y optimización de las propiedades químicas de la molécula para tener un buen candidato clínico. El conocimiento de la diana terapéutica de una molécula permite el uso de métodos

estructurales y bioquímicos (Stoll et al., 2011; Wilson and Lill, 2011), que pueden guiar la mejora de la potencia de la molécula y ser de gran ayuda en los estudios de toxicidad (Garcia-Serna and Mestres, 2010). Por tanto, aunque la identificación de la diana de un compuesto no es un proceso esencial para su desarrollo, es altamente recomendable para descubrimiento de nuevos antimaláricos.

Por ello otra aproximación para el descubrimiento de nuevos antimaláricos es llevar a cabo campañas de HTS mediante un diseño racional basado en una diana terapéutica. Dicha estrategia requiere de un conocimiento profundo sobre la proteína en cuestión y su validación previa. La proteína debe ser expresada y se debe poner a punto un ensayo *in vitro* bioquímico en formato HTS, para identificar compuestos inhibidores o activadores de dicha proteína. Sin embargo, se ha visto que la mayoría de los inhibidores encontrados mediante esta estrategia, pierden su actividad en la célula por no ser capaces de atravesar las membranas, existiendo una desconexión entre el ensayo bioquímico y el celular. La modificación de la molécula para incrementar la permeabilidad no es siempre sencilla, lo que ha llevado a que la aproximación fenotípica sea la más utilizada. La estrategia ideal podría ser aquella en la que se utilizasen ambas aproximaciones, célula entera y diseño racional en tándem. Es decir, generar con rapidez candidatos utilizando el ensayo de célula entera, y luego determinar el mecanismo de acción de éstos y su diana, bien para facilitar su desarrollo, o para identificar compuestos estructuralmente diferentes que vayan a través de la misma (realizando un HTS posterior basado en la proteína).

Actualmente se están realizando múltiples estudios en diferentes grupos de investigación, con el objetivo de encontrar nuevas dianas terapéuticas. A pesar de ello, el número de ellas continúa siendo limitado. Aunque el 60% de las proteínas del parásito no tienen ortólogo en humano (Gardner et al., 2002), y por tanto la especificidad podría estar favorecida, no todas las proteínas pueden ser consideradas dianas terapéuticas desde el punto de vista farmacológico. La esencialidad es una característica fundamental, ya que su disrupción o bloqueo debe producir la muerte del parásito, pero además la proteína debe permitir la unión de una molécula. Además, las moléculas deben ejercer su función en el contexto intracelular con una biodisponibilidad y toxicología adecuada.

El Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS) es una de las pocas dianas terapéuticas que pueden ser consideradas como validadas en *P. falciparum*. Dicho sistema cumple con la premisa de ser esencial y además de ser capaz de ser bloqueado por compuestos, lo cual se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* con el uso de inhibidores de proteasoma, desarrollados para el tratamiento del cáncer en células de mamífero (ver ANEXO I).

2.2. EL UPS COMO DIANA TERAPEÚTICA

2.2.1. Componentes del UPS

La ubiquitinación es uno de los mecanismos de regulación postraduccionales más importantes en la célula eucariota, formando parte de uno de los sistemas proteolíticos principales para la degradación de proteínas de vida corta (Weissman et al., 2011). Regula factores celulares esenciales implicados en diversos mecanismos como la apoptosis, ciclo celular, reparación del ADN, control de calidad de proteínas, estrés oxidativo, endocitosis y respuesta a la infección por patógenos.

El UPS es un sistema complejo compuesto por múltiples maquinarias moleculares, que actúan de manera sincrónica para mantener el equilibrio entre sus componentes. Este sistema consta de dos pasos diferenciados. En primer lugar se produce la conjugación de la ubiquitina a proteínas sustrato (ubiquitinación) (Hershko and Ciechanover, 1998), y tras esto tiene lugar la proteólisis de algunas de las proteínas ubiquitinadas por el proteasoma. Dicha degradación no sucede en todos los casos, ya que la ubiquitinación es un sistema de regulación por sí mismo (Chen and Sun, 2009).

Aunque la degradación por el proteasoma es uno de los mecanismos de regulación más habituales, las proteínas ubiquitinadas pueden ser también reconocidas por dominios específicos de unión presentes en distintas proteínas, que puede llevar a la activación o inhibición de ciertas rutas de señalización, de forma similar a lo que sucede con la fosforilación. Por ejemplo, en el daño al ADN la

ubiquitinación de ciertas proteínas lleva al ensamblado de complejos de reparación del ADN (Chen and Sun, 2009). Además de inducir la interacción de proteínas, se ha visto que la ubiquitinación puede regular alostéricamente la proteína ubiquitinada, produciendo un cambio conformacional que lleva a la inactivación de la proteína de forma independiente a la degradación (Scaglione et al., 2007), o llevar a su activación (Todi et al., 2009). Este cambio conformacional puede darse por ejemplo, al inducir orden en regiones desordenadas de una proteína, estabilizándola en su conformación activa, o al producirse la interacción de la región ubiquitinada con otra región de la misma proteína donde esté presente algún dominio de unión a ubiquitina (Komander, 2009).

a) Componentes de ubiquitinación y des-ubiquitinación

La **ubiquitina** es una proteína pequeña de 76 aminoácidos, altamente conservada, y que puede encontrarse o bien libre o de forma conjugada a proteínas sustrato en todas las células eucariotas (Figura I.6 y Figura I.8). Su forma activa es generada tras el corte de un precursor de poliubiquitina de alto peso molecular, gracias a la acción de hidrolasas de ubiquitina en C-terminal (UCH). Esta forma madura expone un residuo de glicina, que permite la formación de enlaces isopeptídicos entre dicho residuo y residuos de lisina de las proteínas sustrato (Weissman et al., 2011).

La conjugación de ubiquitina es producida tras una cascada de reacciones tiol-éster, que requiere la acción de tres tipos de enzimas que actúan de forma secuencial: La enzima activadora E1, la enzima conjugadora E2 y la ubiquitina ligasa E3 (Glickman and Ciechanover, 2002; Hershko et al., 1983) (Figura I.6). En mamíferos dos **enzimas activadoras E1** llevan a cabo la activación de todas las moléculas de ubiquitina utilizando ATP. Para ello se produce la adenilación de la glicina terminal de la ubiquitina, transfiriéndose a un residuo cisteína de la enzima E1 y formando un enlace tioéster (Figura I.6). Una vez activada, la ubiquitina es trans-esterificada a la cisteína catalítica de la **enzima conjugadora E2** (Huang et al., 2007) (Figura I.6). Finalmente la **E3 ubiquitina ligasa** cataliza la transferencia de la ubiquitina, desde su cisteína catalítica o desde una E2, a un residuo de lisina de la proteína sustrato, formándose un enlace covalente isopeptídico entre el

carbono terminal de la glicina de la ubiquitina y la amina primaria de la lisina sustrato (Figura I.6).

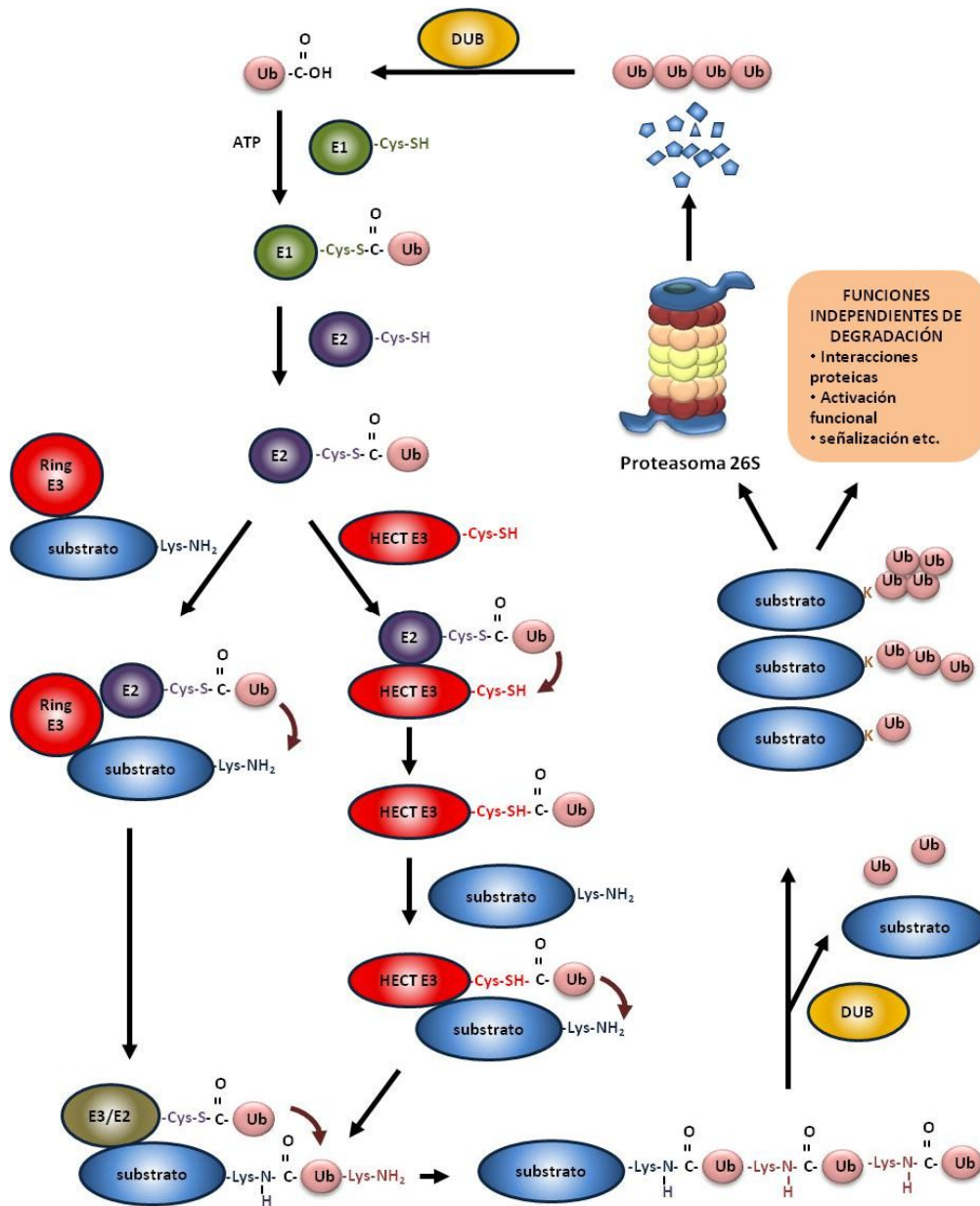


Figura I. 6. Sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS). El proceso de conjugación de ubiquitina comienza con la activación del residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina por una enzima activadora E1. Una vez activada la ubiquitina, es transferida a una enzima conjugadora E2. Las E2 pueden unirse a E3 ligasas con dominios HECT formando un intermediario tiol-éster. La E3 reconoce al sustrato transfiriéndole la ubiquitina. Las E2 también pueden unirse a otro tipo de E3 ligasas como las RING, que funcionan como adaptadoras entre el sustrato final y la E2 para promover su ubiquitinación. La ubiquitinación del sustrato se produce cuando la glicina C-terminal de la ubiquitina es unida a un grupo amino de una lisina del sustrato. La ubiquitina posee además siete lisinas que pueden aceptar otras ubiquitinas formando cadenas de diferentes tipos (Figura I.8 y Figura I.9). La ubiquitinación marca la proteína para su degradación por el proteasoma o lleva a otras funciones. El proceso puede ser revertido mediante la acción de enzimas DUBs.

A pesar de que existe un número relativamente pequeño de E2 que aceptan ubiquitina (30-40) en células de mamífero, no sucede lo mismo con las enzimas E3, puesto que son las que interaccionan específicamente con las proteínas a ubiquitinar. Las E3 ubiquitina ligasas son un grupo muy diverso compuesto por cientos de ellas (más de 600 en humano), habiendo sido clasificadas en tres clases principales, dependiendo de la presencia de tres dominios específicos: HECT (E6-associated protein C-terminus), RINGS (Really Interesting New Proteins) y U-box. Dentro de la familia RING se encuentran además dos subclases, las RBR (RING in between RING-RING) y las CRL (Cullin-RING ligases) (Shi and Grossman, 2010). Estas últimas son la subclase más abundante de E3 ligasas. Forman complejos multiproteicos de E3s y están implicadas en la regulación de vías de señalización, apoptosis y ciclo celular. Un ejemplo de ello es la CRL Anaphase-Promoting Complex (APC), que controla la progresión del ciclo celular. La diferencia fundamental entre las diferentes familias de E3 ligasas, es la forma de transferir los residuos de ubiquitina a los substratos diana (Hatakeyama and Nakayama, 2003; Lechner et al., 2006). Las E3 ubiquitina ligasas con dominios HECT forman un intermediario E3-ubiquitina antes de transferir la ubiquitina a la proteína sustrato, mientras que el resto de E3 ligasas no forman dicho intermediario tiol-ester, sino que funcionan como adaptadores que unen a las E2 previamente activadas y a la proteína a modificar, aproximándolas y por tanto promoviendo la ubiquitinación de la proteína sustrato (Figura I.6).

Debido al importante papel que ejercen las E3 ubiquitina ligasas como reguladores de distintos procesos celulares, multitud de patógenos han desarrollado diferentes mecanismos para manipular la célula hospedadora a través de ellas, interfiriendo con su maquinaria de ubiquitinación en su propio beneficio (Alomairi et al., 2015; Ashida et al., 2014). El UPS es clave en la respuesta inmune, ya que al ser una modificación postraduccional, permite que la célula pueda reaccionar y defenderse rápidamente ante la presencia de un patógeno. Por ello, muchos agentes infecciosos secretan proteínas en la célula hospedadora que mimetizan alguna proteína E3 ligasa del hospedador, o que funcionan como sustratos de su sistema de ubiquitinación. Otros patógenos por el contrario, poseen E3 ligasas con estructuras novedosas. Estas E3 ligasas llevan a la inhibición

de la respuesta inmune del hospedador o a la activación de determinados mecanismos que le permitan sobrevivir en su interior.

La conjugación por ubiquitina de las proteínas sustrato es altamente reversible gracias a la acción de proteasas específicas, las des-ubiquitininas (**DUBs**) (Figura I.6 y Figura I.7). Estas proteasas rompen los enlaces isopeptídicos generados entre el grupo amino de la lisina de la proteína sustrato y el grupo C-terminal de la ubiquitina conjugada. Dentro de este grupo existen una gran variedad de proteasas implicadas en el metabolismo de la ubiquitina. A pesar de que su papel biológico aún no está del todo establecido, se sabe que son reguladores clave del sistema, ejerciendo un papel similar a las fosfatasas en el sistema de fosforilación. Regulan tanto positiva como negativamente el UPS, y están implicadas en el reciclaje, procesamiento de los precursores de ubiquitina y desensamblaje de cadenas de ubiquitina.

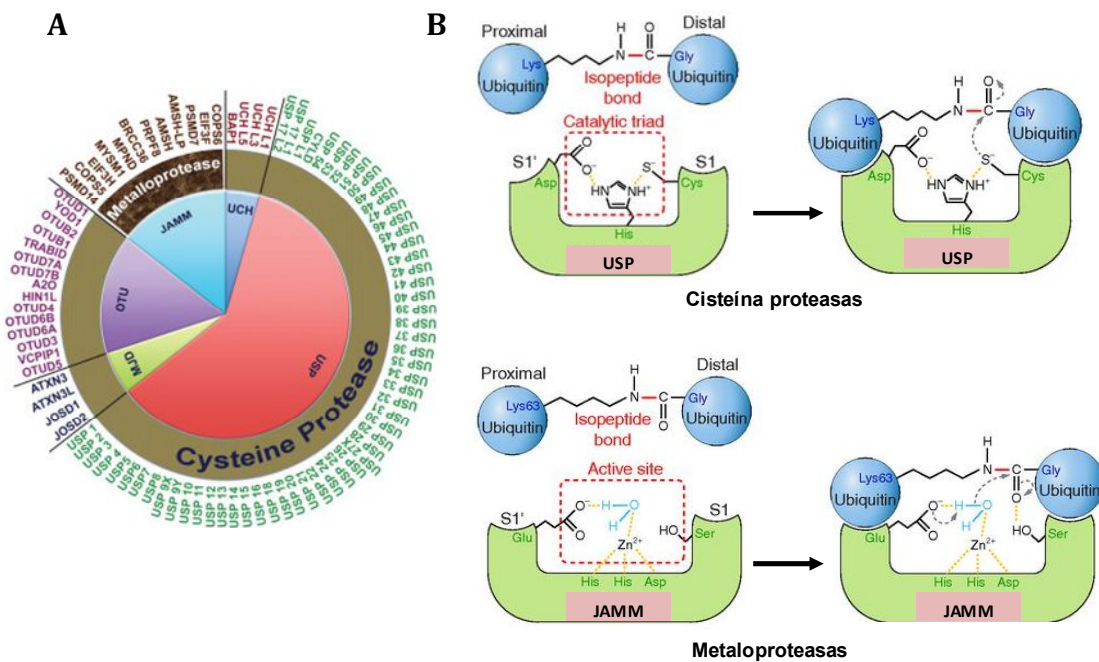


Figura I. 7. Tipos de DUBs. **A.** Clasificación de las DUBs en el humano. Las 5 clases identificadas en el genoma, están representadas por diferentes colores. Todas son cisteína proteasas excepto las JAMM que son metaloproteasas. **B.** Centro activo y ataque a la unión isopeptídica de un péptido diubiquitina en las DUBs cisteína proteasas USP, y las metaloproteasas JAMM. En negro uniones covalentes, rojo uniones isopeptídicas y en naranja uniones no covalentes. En las cisteína proteasas un grupo tiol desprotonado lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico, mientras que en las metaloproteasas es una molécula de agua situada en el centro activo la que produce el ataque nucleofílico al carbono carbonílico del enlace isopeptídico. Fuente: *Hanpude et al., 2015*

En humanos se han encontrado alrededor de 95 DUBs, que han sido clasificadas en 5 subgrupos, en base a sus potenciales mecanismos de acción y características estructurales. Las cisteína proteasas USPs (Ubiquitin-specific proteases), UCHs (Ubiquitin C-terminal hydrolases), OTUs (Ovarian tumor proteases), MJDs (Machado-Joseph-domain containing proteases) y las metaloproteasas JAMMs (JAMM/MPN+ metalloenzymes) (Hanpude et al., 2015). El mecanismo catalítico de cisteína proteasas y metaloproteasas se encuentra descrito en la Figura I.7. Al igual que sucedía con las E3 ligasas, muchos patógenos secretan DUBs homólogas a las del hospedador para reducir la respuesta inmune.

En cuanto a las formas de ubiquitinación, existen múltiples formas diferentes, ya que la ubiquitina posee 7 residuos de lisina en su superficie susceptibles de ser a su vez ubiquitinados (K6, K11, K27, K29, K33, K48 and K63) (Figura I.8) formando cadenas (Komander, 2009). La cantidad de ubiquitina en sus diferentes formas varía según el tipo celular. En células HEK293 y en fibroblastos embrionarios MEFs, se ha visto que el 20% del total de ubiquitina presente en las células es ubiquitina libre, el 60% proteínas ubiquitinadas y el 20% forman cadenas de poliubiquitina. Sin embargo, en el cerebro del ratón y en el cortex frontal humano los niveles de ubiquitina libre son mayores, siendo el 60% y el 80% respectivamente (Kaiser et al., 2011).

Aunque algunas proteínas pueden ser ubiquitinadas por una sola molécula de ubiquitina en una sola lisina (monoubiquitinación) o en varias (multi-monoubiquitinación), en muchos casos las proteínas están poliubiquitinadas con distintos tipos de cadenas, las cuales están a su vez relacionadas con su función (Figura I.9). La monoubiquitinación produce la internalización de receptores y la subsecuente degradación en lisosomas (Haglund et al., 2003). Además de esto se ha visto implicada en la respuesta al daño de ADN, modificando entre otras proteínas histonas y la proteína PCNA (Sigismund et al., 2004; Komander, 2009).

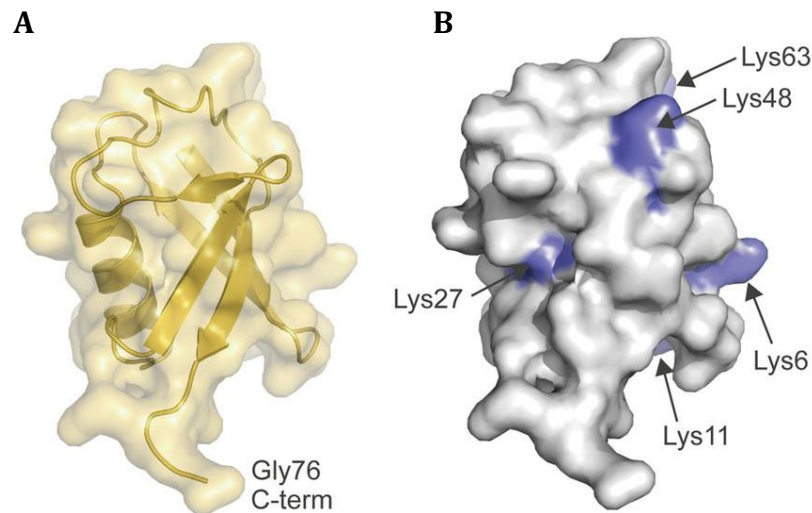


Figura I. 8. Representación de la ubiquitina. A. Representación de Ribbon y de superficie. B. Representación de superficie. En azul, localización de los residuos de lisina en la ubiquitina. Adaptado de la fuente: *Hurley et al., 2006*

El tipo de cadena difiere dependiendo de la lisina que se ubiquitine (Figura I.8 y I.9). Por ejemplo las cadenas K48, son cadenas cuyos residuos de ubiquitina están unidos a través de la lisina 48 de la ubiquitina. El número de moléculas de ubiquitina unida y el tipo de cadenas formadas modifican drásticamente las propiedades bioquímicas de las proteínas sustrato, determinando el efecto en la función de la proteína modificada. Las diferentes cadenas adoptan conformaciones distintas (Figura I.9), que marcan la interacción con otras proteínas con dominios de reconocimiento a ubiquitina. En humano se han encontrado al menos 20 dominios de unión a ubiquitina. Por ejemplo, los dominios UBA (ubiquitin-associated), que son capaces de unirse entre la unión de ubiquitinas de las cadenas K48, aunque también reconocen otros tipos de cadenas (Trempe et al., 2005; Komander, 2009). Los dominios UBAN (ubiquitin binding domains in ABINS) se unen con más afinidad a cadenas lineales (Rahighi et al., 2009), mientras que los UIMs (ubiquitin-interacting motif) reconocen las cadenas K48 y cadenas K63, dependiendo de la longitud de la región de unión (Sato et al., 2009; Komander, 2009).

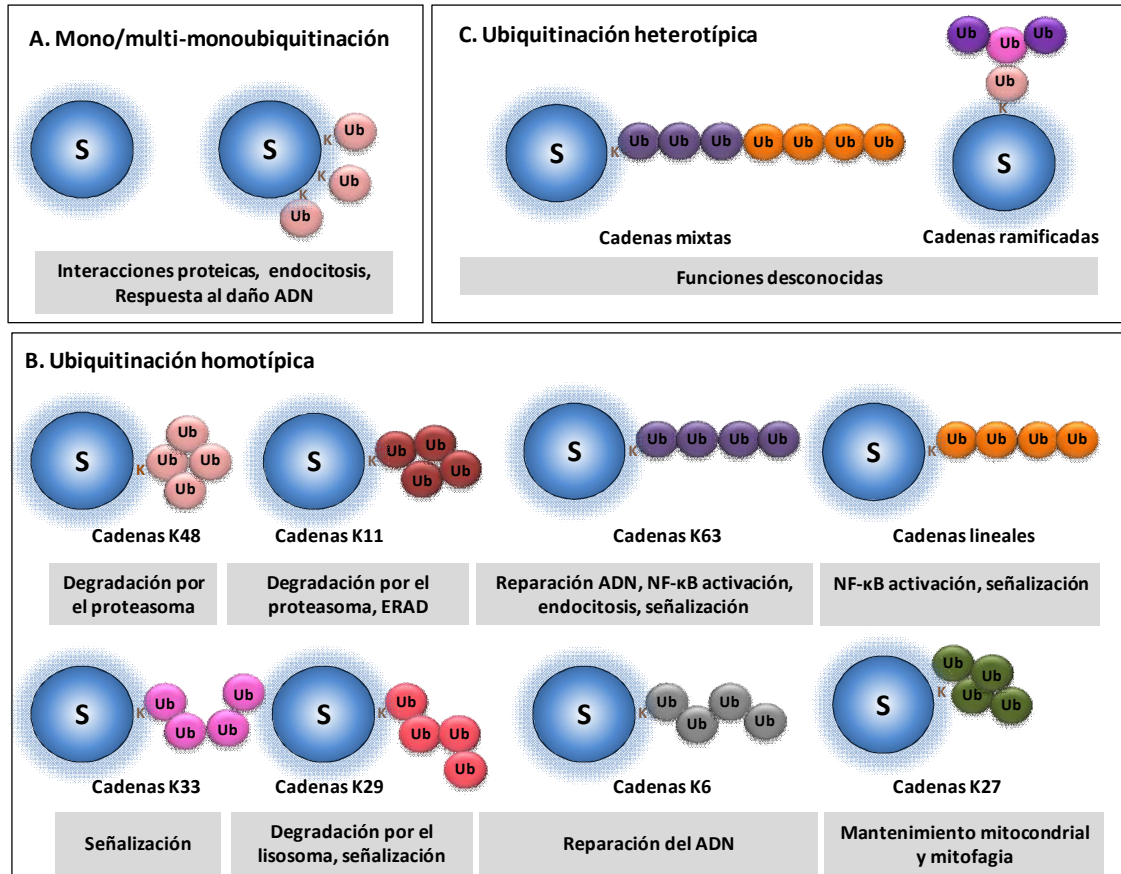


Figura I. 9. Formas de ubiquitinación. A. Mono o multiubiquitinación. Proteínas marcadas con una o más ubiquitinas que no forman cadenas. **B. Ubiquitinación homotípica.** Cadenas de un solo tipo de unión que llevan a distintos tipos de conformaciones en las cadenas. **C. Ubiquitinación heterotípica.** Cadenas con uniones mixtas. Ubiquitinas unidas entre sí por uno o más residuos diferentes de lisina.

Durante años se pensó que el único papel de la ubiquitinación era marcar las proteínas para su degradación a través del proteasoma, gracias a la ubiquitinación con cadenas de tipo K48. Las cadenas de ubiquitina K48 suelen estar formadas por dímeros o tetrámeros que adoptan una estructura compacta, al haber un contacto entre la superficie de los monómeros que las conforman (Eddins et al., 2007) (Figura I.9). Dichas cadenas de ubiquitina son reconocidas a través de dominios de unión a ubiquitina de proteínas presentes en el proteasoma, llevando a la degradación de la proteína substrato que las contiene y a la inactivación de sus funciones. En las últimas dos décadas se le han asociado un gran número de procesos celulares independientes a la degradación (Ciechanover, 2005).

Múltiples procesos celulares como el ciclo celular y la apoptosis son regulados a través de la degradación de algunos de sus componentes (Ciechanover, 2005; Komander, 2009). Sin embargo, recientemente se ha visto la implicación en la degradación de otras cadenas como la K11 (Figura I.9) (Kulathu and Komander, 2012). Este tipo de cadenas están implicadas en diferentes vías de señalización, como lo son el control de ciclo celular y la vía de degradación del retículo endoplasmático (ERAD) (Xu et al., 2009). Aunque las proteínas ubiquitinadas por K48 son degradadas más rápidamente que el resto *in vitro* (Xu et al., 2009), análisis proteómicos realizados tras la inhibición del proteasoma, han revelado la acumulación de proteínas sustrato conjugadas con todos los tipos de cadenas en diferentes grados (excepto K63), mostrando la redundancia de dicha función. La razón de la existencia de los diferentes tipos de cadenas para un mismo mecanismo de degradación, podría explicarse por los diferentes reguladores específicos de cadenas de poliubiquitina que se encuentran por encima del proteasoma. Es decir, las proteínas transportadoras que reconocen las proteínas ubiquitinadas y las llevan al proteasoma, los diferentes receptores de ubiquitina del proteasoma que influyen en la velocidad de degradación dependiendo del tipo de cadena, o las DUBs específicas de cadena, cuya cinética de hidrólisis varía influyendo también en la velocidad de degradación (Komander, 2009).

A diferencia de las cadenas K48, las K63 adoptan una estructura extendida y abierta (Figura I.9), puesto que las moléculas de ubiquitina que la componen no interaccionan entre ellas (Tenno et al., 2004). Se ha visto que estas cadenas están implicadas en endocitosis, disminuyendo el número de receptores de la superficie celular (Williams and Urbe, 2007), en procesos de señalización como el de las citoquinas (Skaug et al., 2009) y en la respuesta al daño al ADN, regulando proteínas como el PCNA o las histonas, aunque con distinta funcionalidad que en el caso de la monoubiquitinación (Kulathu and Komander, 2012; Komander, 2009).

En cuanto al papel fisiológico de las cadenas K6, K27, K29 y K33 aún no está del todo claro. La ubiquitinación de proteínas como BRCA1 por cadenas K6 indican que éstas podrían estar implicadas en la reparación del ADN (Sobhian et al., 2007), mientras que las cadenas K27 se han visto implicadas en el mantenimiento mitocondrial y mitofagia (Birsa et al., 2014) (Figura I.9). Las cadenas K29 y K33

por su parte, regulan diferentes procesos a través de la modificación de kinasas como la AMPK o MARK bloqueando su activación (Al-Hakim et al., 2008). Las cadenas K29 también están implicadas en la degradación a través del lisosoma (Chastagner et al., 2008; Kulathu and Komander, 2012; Komander, 2009).

Además de las cadenas unidas a través de las diferentes lisinas de la ubiquitina, también es posible la formación de cadenas unidas por enlaces peptídicos a través del grupo α -amino N-terminal. Estas cadenas tienen una conformación lineal abierta similar a la K63, y al igual que éstas se han visto implicadas en procesos de señalización (Iwai and Tokunaga, 2009; Komander, 2009).

Dentro del UPS se encuentran además otras 15 proteínas de la familia ubiquitina, que también pueden ser conjugados a proteínas a través del mismo mecanismo, formando cadenas. Entre ellas están las proteínas SUMO (small ubiquitin-like modifier), NEDD8 (neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein-8), UBL5 (ubiquitin-like protein-5) y las proteínas de autofagia ATG8 y ATG12 entre otras. Algunas de éstas proteínas como SUMO o NEDD8 pueden formar cadenas híbridas con la ubiquitina, añadiendo mayor complejidad al sistema, aunque su función genérica aún no ha sido elucubrada (Hochstrasser, 2009).

b) Proteasoma

El **proteasoma 26S** es el proteasoma constitutivo de la célula. Es un complejo multimérico compuesto por un núcleo catalítico denominado **20S**, y por una o dos partículas **19S** reguladoras que flanquean sus extremos y que regulan la entrada de las proteínas ubiquitinadas al núcleo 20S (Bedford et al., 2010) (Figura I.10A).

El proteasoma 20S adopta una estructura cilíndrica en forma de barril, ya que está compuesto por 4 anillos heptaméricos apilados. Los dos anillos situados en la parte más externa están formados por 7 subunidades alfa ($\alpha 1-\alpha 7$), cuya función es permitir la interacción con la partícula 19S. Los dos anillos internos por su parte, están compuestos por 7 subunidades beta cada uno ($\beta 1-\beta 7$), tres de las cuales son responsables de la actividad catalítica del proteasoma (Figura I.10B). El

mecanismo catalítico de las subunidades catalíticas es el mismo, variando la especificidad por el sustrato (Figura I.10B y C). El grupo hidroxilo de la treonina N-terminal de las subunidades beta catalíticas llevan a cabo un ataque nucleofílico sobre el carbono de la unión peptídica (Borissenko and Groll, 2007a; Kisselev and Goldberg, 2001; Kisselev et al., 2012). Las subunidades **$\beta 1$** rompen las proteínas después de aminoácidos ácidos, ya que tiene una actividad PHGH (peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing) o caspasa, las subunidades **$\beta 2$** lo hacen después de aminoácidos básicos teniendo actividad tripsina, y por último las subunidades **$\beta 5$** cortan después de aminoácidos hidrofóbicos, puesto que tienen actividad quimiotripsina (Figura I.10B). Estudios con mutantes de levaduras han mostrado que la subunidad catalítica más crítica es la subunidad $\beta 5$, puesto que su inactivación causa los mayores defectos en el crecimiento. Los dobles mutantes $\beta 1$ y $\beta 2$ muestran defectos en el crecimiento menores al anterior, y los mutantes en $\beta 2$ no tienen grandes defectos de crecimiento (Chen and Hochstrasser, 1996; Heinemeyer et al., 1997). Sin embargo, en mamíferos se ha visto que la sola inhibición de la subunidad $\beta 5$ no es suficiente para una completa inhibición del crecimiento de las células, sino que se requiere la coinhibición de la $\beta 5$ con $\beta 2$ y/o $\beta 1$. Los tres sitios catalíticos podrían estar contribuyendo significativamente a la proteólisis, y su importancia podría variar dependiendo del sustrato (Kisselev et al., 2006).

Aunque el barril 20S permite la entrada a toda cadena polipeptídica desplegada, su puerta de acceso permanece cerrada (Figura I.10C). Su apertura y regulación requiere de la acción de las partículas reguladoras 19S, las cuales restringen el acceso a proteínas ubiquitinadas que han sido previamente seleccionadas por el UPS (Groll and Potts, 2011).

Las partículas 19S están formadas a su vez por dos partes, la base y la tapa (Figura I.10A). La tapa contiene 9 cadenas polipeptídicas implicadas en el reconocimiento de las proteínas ubiquitinadas, así como en la retirada de las cadenas de ubiquitina. La base por su parte, interacciona directamente con los anillos α del 20S, estando formada por subunidades no ATPasa (RPN1, RPN2 y RPN13) y ATPasa (RPT1–RPT6). Las subunidades ATPasa son las responsables del desplegado de las proteínas, de la apertura de la puerta de la cámara catalítica 20S

y de la translocación de las proteínas a dicha cámara catalítica. La hidrólisis de ATP tan solo es necesaria para el desplegado de las proteínas, el resto de procesos como la apertura de la puerta, translocación e hidrólisis del sustrato tan solo requieren de la interacción del ATP (Huber and Groll, 2012) (Figura I.10C).

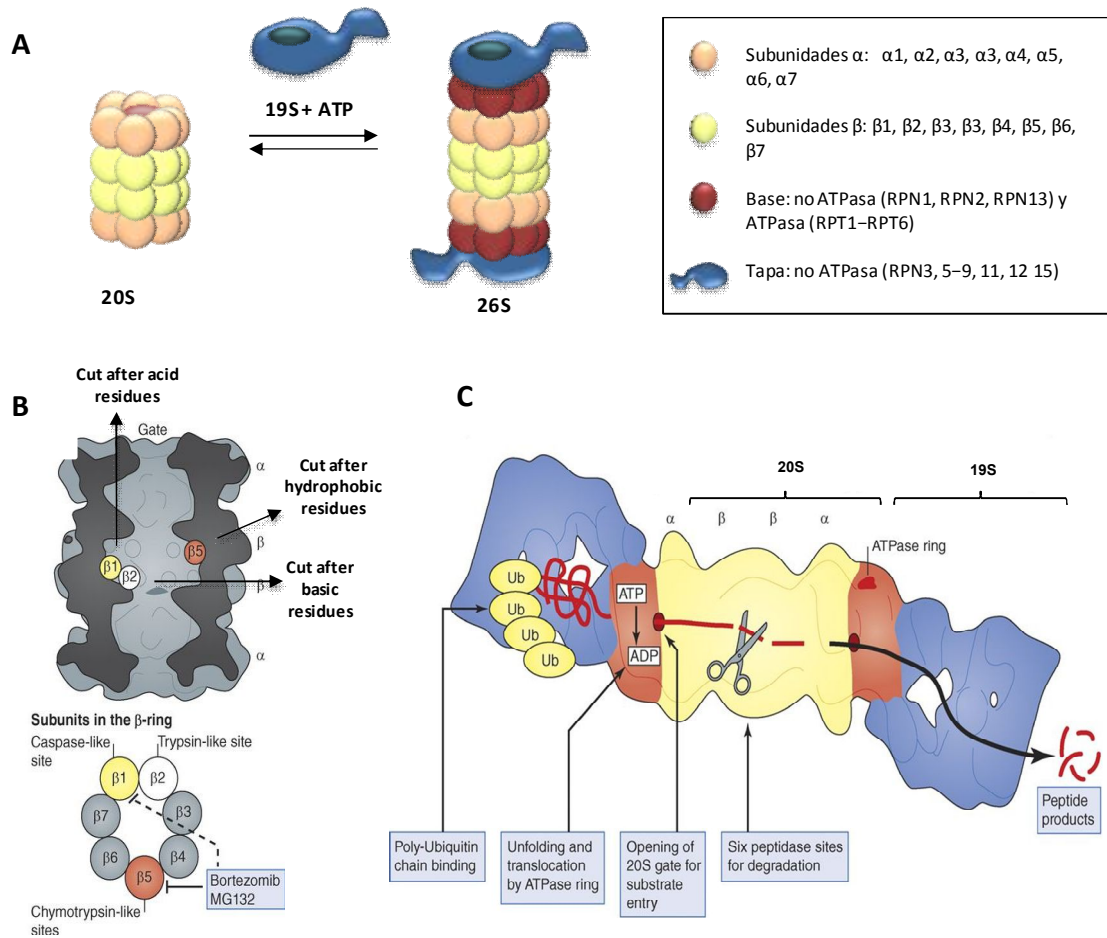


Figura I. 10. Representación del proteasoma. A. Composición del proteasoma 26S. **B.** Subunidades catalíticas. Adaptado de la fuente: *Goldberg 2012*. **C.** Representación del funcionamiento del proteasoma. Adaptado de la fuente: *Goldberg 2012*.

Además del proteasoma constitutivo ya descrito, existe el llamado **inmunoproteasoma**, generado en respuesta a señales inflamatorias como el interferón gamma o citoquinas. El UPS está implicado en la respuesta celular frente a la infección por patógenos, gracias a éste y a otros procesos celulares como la vía NF κ B (Chen, 2005; Bhoj and Chen, 2009; Ashida et al., 2014). El

inmunoproteasoma se caracteriza por tener intercambiadas las partículas 19S por las **11S**, y las subunidades catalíticas por subunidades alternativas (**β 1i**, **β 2i**, y **β 5i**). La partícula 11S, está formada por 7 proteínas unidas por el mismo sitio que el 19S a las subunidades α , regulando de forma similar aunque no idéntica la apertura de la puerta al 20S. En cuanto a las subunidades catalíticas, poseen una mayor actividad quimiotripsina y tripsina (Aki et al., 1994; Akiyama et al., 1994), generando un mayor número de péptidos. Estos péptidos funcionan como antígenos que son presentados por el MHC-I (Major Histocompatibility Complex class I) en la superficie celular, generando la respuesta inmune (Borissenko and Groll, 2007b). El inmunoproteasoma está también implicado en la prevención de muerte celular por el estrés oxidativo producido por el interferón, puesto que facilita la degradación de agregados proteicos (Seifert et al., 2010).

2.2.2. Métodos de estudio del UPS

Durante la última década se han publicado multitud de estudios describiendo la función, estructura y papeles fisiológicos de diferentes componentes del UPS. Debido a la gran complejidad del sistema, el análisis por espectrometría de masas (MS) ha llegado a ser la técnica más común para el análisis de proteínas ubiquitinadas, los sitios de ubiquitinación, y para el estudio de los distintos tipos de cadena y su función en diferentes organismos (Xu et al., 2009). A pesar de ello, la ubiquitinación es la modificación postraducciona l más difícil de identificar por MS debido a varias razones: a) Tan solo uno de los varios residuos de lisina de una proteína son modificados, b) La ubiquitina tiene un tamaño mayor que otros modificadores postraduccionales como la fosforilación o acetilación, incrementando la dificultad de ser detectada directamente por MS, c) La ubiquitinación no posee motivos muy conservados, haciendo difícil predecir los sitios de ubiquitinación de proteínas mediante herramientas informáticas (Kim et al., 2011) y d) La cantidad de proteínas ubiquitinadas en condiciones fisiológicas normales es muy baja, debido a la rápida degradación por el proteasoma, y a la regulación dinámica que existe entre la unión por ligasas y la eliminación de los

residuos de ubiquitina por DUBs a los substratos, en las distintas vías de señalización.

Todo esto hace que existan obstáculos técnicos que dificultan analizar el estado de ubiquitinación de las proteínas, haciendo esencial la utilización de sistemas eficientes de preservación y enriquecimiento del material ubiquitinado.

2.2.2.1. Métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas

Existen principalmente tres sistemas de purificación y enriquecimiento de proteínas ubiquitinadas. La expresión de ubiquitina unida a una etiqueta para su posterior purificación, la inmunoprecipitación mediante anticuerpos anti-ubiquitina y la purificación mediante dominios de unión a ubiquitina (Xu and Jaffrey, 2013) (Tabla I.1).

a) Expresión de ubiquitina marcada con una etiqueta para el aislamiento de proteínas ubiquitinadas en células

Varias etiquetas (tags) de afinidad han sido usados para marcar la ubiquitina en su región N-terminal, y así aislar las proteínas ubiquitinadas de células de levadura y de mamífero (Jeon et al., 2007; Kirkpatrick et al., 2005a; Peng et al., 2003; Meierhofer et al., 2008; Tagwerker et al., 2006; Danielsen et al., 2011) para su posterior identificación. La ubiquitina es expresada en las células, siendo incorporada junto con las proteínas. Esto permite que las proteínas ubiquitinadas puedan ser después purificadas utilizando resinas que se unen a la etiqueta en cuestión, para ser posteriormente identificadas por MS (Figura I.11A).

La etiqueta de afinidad más común para identificar factores de regulación por ubiquitinación, es la 6xHIS, cuya purificación se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad con resinas de Ni²⁺ quelado (Ni-NTA) (Beers and Callis, 1993; Kirkpatrick et al., 2005b) (Figura I.11A). Una de las desventajas de este método radica en que la purificación mediante Ni-NTA requiere el uso de condiciones desnaturalizantes para disminuir la unión de proteínas inespecíficas, ya que esta resina también interacciona con proteínas ricas en histidina (Tabla I.1).

Otra etiqueta que se ha utilizado para marcar la ubiquitina es el péptido corto BAP (GLNDIFEAQKIEWHE) (Beckett et al., 1999). El residuo de lisina de este péptido es capaz de aceptar biotina exógena suplementada en presencia de la enzima biotina sintetasa BIRA de *E. coli*. Esto mejora la purificación de las proteínas ubiquitinadas, ya que la biotina tiene una gran afinidad por la estreptavidina, pero a la vez dificulta la elución de las proteínas una vez unidas a la resina. Además, algunas proteínas endógenas biotiniladas pueden ser co-purificadas. Para identificar las proteínas específicas purificadas, se han co-expresado en las células ambas etiquetas, 6xHIS y BAP, para su purificación de forma consecutiva (Tagwerker et al., 2006; Ota et al., 2008).

A pesar de que estas estrategias han mostrado ser de gran utilidad, la mayor desventaja es que la expresión de ubiquitina marcada puede llevar a que el marcaje tenga una influencia en la fisiología de la célula, pudiendo llevar a conclusiones erróneas (Tabla I.1). Debido a ello, han aparecido otras estrategias que permiten la purificación de proteínas ubiquitinadas de células no modificadas genéticamente, tejidos o muestras de pacientes.

b) Inmunoprecipitación mediante anticuerpos de unión a ubiquitina.

Varios tipos de anticuerpos policlonales y monoclonales anti-ubiquitina están disponibles para detectar tanto ubiquitina libre como conjugada, aunque poseen mayor afinidad por esta última. En general los anticuerpos monoclonales son más apropiados para el aislamiento de proteínas ubiquitinadas (Figura I.11B). Uno de los anticuerpos más utilizados son los monoclonales FK2 y FK1 (Fujimuro et al., 1994). Ambos reconocen las proteínas poliubiquitinadas, pero FK2 también es capaz de unirse a las monoubiquitinadas. Ninguno de estos anticuerpos reconoce la ubiquitina libre. Se han utilizado tanto para tinción inmunológica, como para cuantificación, purificación y aislamiento de proteínas ubiquitinadas endógenas para su identificación por MS (Takada et al., 2001; Matsumoto et al., 2005; Vasilescu et al., 2005). Existen también otros anticuerpos monoclonales que reconocen uniones específicas en las cadenas de poliubiquitina como la K11, K48 y K63, habiendo sido utilizados para la inmunoprecipitación de cadenas específicas (Matsumoto et al., 2010; Newton et al., 2008).

Las ventajas fundamentales de esta aproximación es que la purificación e identificación de proteínas ubiquitinadas se lleva a cabo en condiciones fisiológicas, sin la necesidad de una manipulación genética, pudiendo ser aplicada a diferentes tipos de muestras de tejidos, pacientes, etc. Otra ventaja es la posible identificación de cadenas específicas con los anticuerpos adecuados, específicos de cadena. Las desventajas son el alto coste de los anticuerpos y la unión inespecífica de proteínas durante la inmunoprecipitación (Tabla I.1).

c) Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante dominios de unión a ubiquitina (UBDs)

Otra aproximación para aislar proteínas ubiquitinadas sin necesidad de la expresión de ubiquitina marcada, es mediante el uso de dominios de unión a ubiquitina (UBDs) contenidos en algunas E3 ligasas, DUBs y receptores de ubiquitina (Figura I.11C). El dominio UBA y el UIM están presentes en proteínas como la subunidad S5A (RPN10) del proteasoma, o en proteínas implicadas en el transporte de las proteínas ubiquitinadas al proteasoma, como RAD23, p62 y DSK2. Ambos dominios, UBA y UIM, poseen una alta afinidad por las proteínas ubiquitinadas, lo cual ha sido explotado para la purificación de estas proteínas y su posterior análisis por MS en diferentes estudios proteómicos. Para ello, los dominios son expresados con una etiqueta para su unión a un soporte sólido como la agarosa, permitiendo experimentos de captura (pull-down) (Layfield et al., 2001; Walters et al., 2003; Lowe et al., 2006).

La afinidad de cada uno de los UBDs por las diferentes formas de ubiquitina es diferente. Por ejemplo, los dominios UBA poseen una afinidad más alta por cadenas de poliubiquitina como la K48, K63, K29, K11, K33 y K6, que por cadenas de monoubiquitina (Raasi et al., 2005). Existen también, diferencias de afinidad por cadena entre los UIMs y los UBA, pudiendo capturar proteínas diferentes.

Al igual que en las aproximaciones anteriormente descritas, el uso de inhibidores de cisteína proteasas como la iodoacetamida (IAA) y el N-ethylmaleimida (NEM), e inhibidores del proteasoma, son requeridos para preservar la ubiquitinación nativa de las células. Sin embargo, compuestos como la IAA forma aductos proteicos con la misma masa molecular que el péptido gly-gly

(Figura I.13), pudiendo llevar a una interpretación incorrecta de los datos (Nielsen et al., 2008).

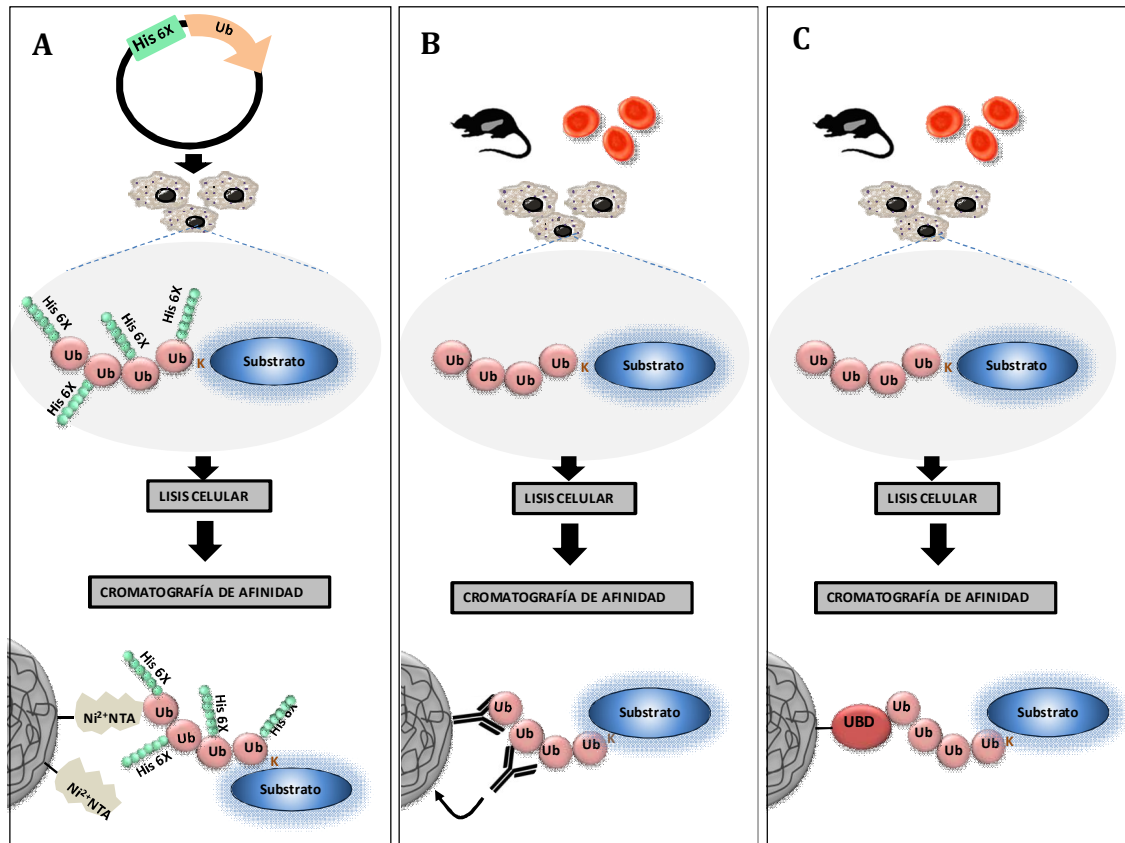


Figura I. 11. Métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas. A. Expresión de ubiquitina unida a una etiqueta para el aislamiento de proteínas ubiquitinadas en células. B. Inmunoprecipitación mediante anticuerpos de unión a ubiquitina. C. Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante dominios de unión a ubiquitina (UBDs).

Para incrementar la eficiencia en la captura de proteínas ubiquitinadas en condiciones nativas, los dominios UBA y los UIMS han sido dispuestos en tándem unidos a una etiqueta para su captura, formando las llamadas TUBEs (tandem ubiquitin binding entities) (Figura I.12). Para una eficiente degradación por el proteasoma se ha visto que son necesarios al menos cadenas de cuatro residuos de ubiquitina (Thrower et al., 2000). Por este motivo las primeras TUBEs fueron diseñadas por el grupo de mi director de tesis, el doctor Manuel S. Rodríguez, con cuatro dominios UBA provenientes de las proteínas Ubiquilina 1 y RAD23. Dichos

dominios fueron clonados en tándem y separados por una región de unión flexible (Hjerpe et al., 2009; Hjerpe and Rodriguez, 2008; Aillet et al., 2012; Lopitz-Otsoa et al., 2010). Distintas etiquetas han sido utilizadas para su detección y captura, la Glutathion S-transferasa (GST), el 6xHIS y el SV5. Los dominios UBA de dichas TUBEs mostraron tener un efecto sinérgico al estar dispuestas en tándem, ya que incrementaban la constante de disociación (K_d) por las cadenas de tetra-ubiquitina K48 y K63 entre 100 y 1000 veces con respecto a la K_d obtenida por un único dominio. Este incremento de afinidad también se observó en la capacidad de unión a proteínas ubiquitinadas y por tanto de su purificación en lisados celulares. Además se vio que las TUBEs eran capaces de proteger frente a la des-ubiquitinación y la acción del proteasoma cuando estaban presentes en la lisis celular, no haciendo por tanto necesario el uso de inhibidores de proteasas, DUBs, proteasoma o inhibidores de cisteína proteasas, para mantener la ubiquitinación nativa (Hjerpe and Rodriguez, 2008). A pesar de que tienen preferencia por proteínas poliubiquitinadas en extractos celulares, también son capaces de reconocer proteínas monoubiquitinadas. Además, las TUBEs se han utilizado en distintos estudios, por ejemplo para identificar el ubiquitoma de células de adenocarcinoma MCF7, en presencia y ausencia del fármaco Adriamicina (Lopitz-Otsoa et al., 2012), lo que valida su uso como herramienta en el estudio del UPS.

Actualmente existen diferentes tipos de TUBEs comerciales que contienen UBA o UIMs de distintas proteínas, y que reconocen diferentes cadenas de ubiquitina con alta afinidad. Esto ha permitido identificar proteínas ubiquitinadas con determinadas cadenas y estudiar su regulación.

Además de todas las ventajas anteriormente descritas, las TUBEs son una herramienta sencilla y económica que permite incrementar la fiabilidad del análisis por MS, al realizarse la purificación en condiciones nativas y sin el uso de inhibidores. La principal desventaja es que al igual que en el resto de estrategias, las proteínas de interacción con proteínas ubiquitinadas pueden ser también co-purificadas, además de poder darse una interacción de proteínas endógenas con la etiqueta, llevando a la purificación de proteínas inespecíficas (Tabla I.1).

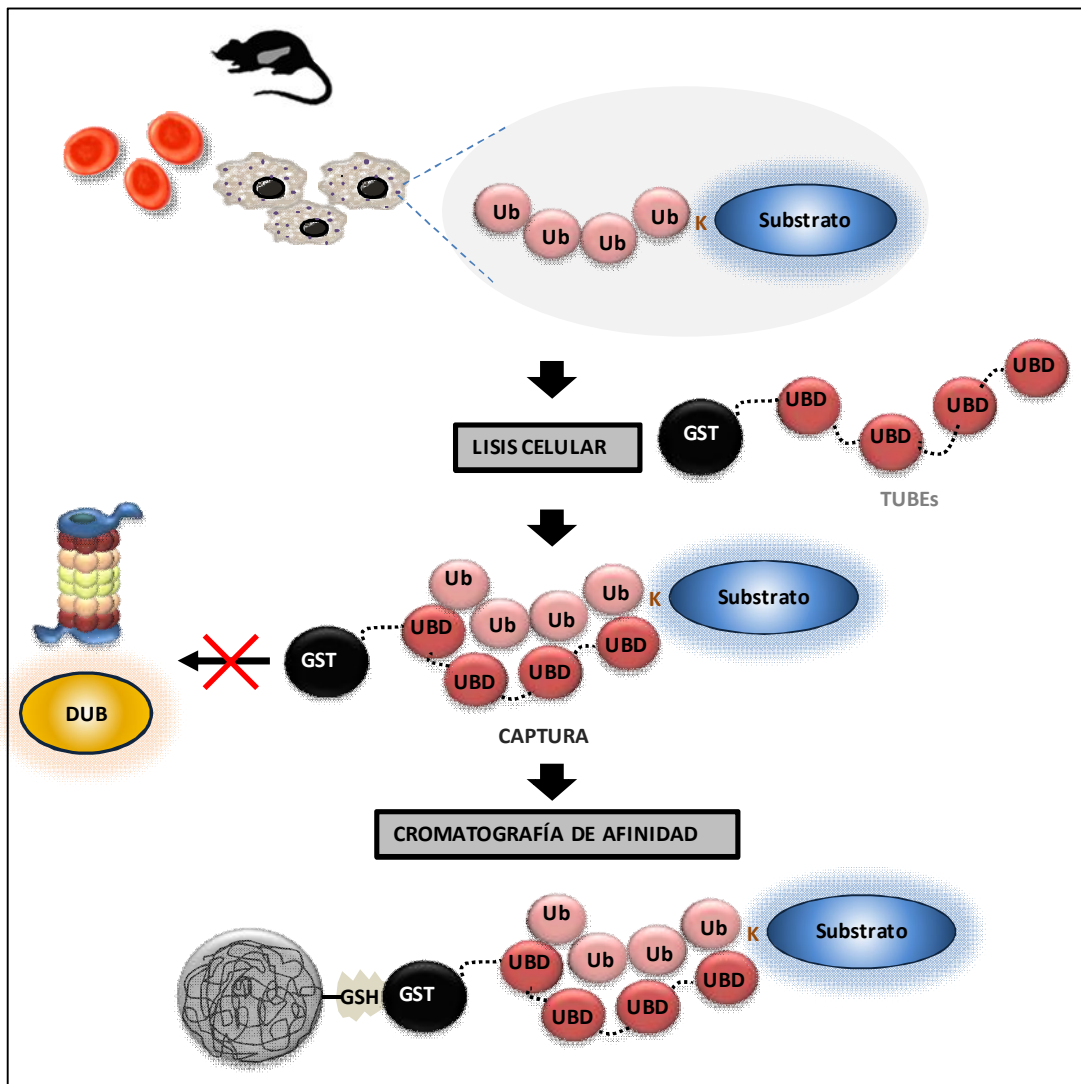


Figura I. 12. Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante TUBEs (tandem ubiquitin binding entities). Las células son lisadas en presencia de las TUBEs. Una vez las proteínas ubiquitinadas son capturadas, se añaden las bolas de agarosa con Glutathione que reconocen la etiqueta GST de las TUBEs. Las proteínas inespecíficas se eliminan de la muestra tras centrifugar y realizar una serie de lavados. Tras esto, las proteínas capturadas son eluidas.

Tabla I. 1. Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de purificación de proteínas ubiquitinadas

	Ventajas	Desventajas
Expresión de ubiquitina marcada	<ul style="list-style-type: none"> • Existen diferentes marcajes versátiles para marcar la ubiquitina • Las condiciones astringentes de lavado reducen las proteínas unidas no específicamente • Es posible la captura de diferentes tipos de ubiquitinación como la mono y multiubiquitinación y la poliubiquitinación 	<ul style="list-style-type: none"> • Las células son manipuladas genéticamente para expresar la ubiquitina marcada, lo que podría alterar la fisiología celular • Ubiquitina libre capturada • No pueden utilizarse tejidos de pacientes
Inmunoprecipitación	<ul style="list-style-type: none"> • Es posible el aislamiento de proteínas con cadenas de ubiquitina específicas. • Compatible con muestras de tejido de pacientes • No manipulación genética 	<ul style="list-style-type: none"> • Las condiciones astringentes de lavado no eliminan completamente las proteínas inespecíficas capturadas • Alto coste • Podrían encontrarse péptidos reconocidos inespecíficamente por el anticuerpo, que afecten la detección de los péptidos ubiquitinados.
Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante UBDs	<ul style="list-style-type: none"> • Se pueden utilizar diferentes UBDs para aislar diferentes tipos de cadena de poliubiquitina • Compatible con muestras de tejido de pacientes • Bajo coste • No manipulación genética 	<ul style="list-style-type: none"> • Las condiciones astringentes de lavado no eliminan completamente las proteínas inespecíficas capturadas • Es necesaria la purificación de UBDs
Aislamiento de proteínas ubiquitinadas mediante TUBEs	<ul style="list-style-type: none"> • Se pueden utilizar diferentes tipos de UBDs dispuestos en tándem para aislar diferentes tipos de cadena de poliubiquitina • Alta afinidad por proteínas ubiquitinadas • Protegen frente a la degradación de las DUBs y proteasoma. No es necesario añadir inhibidores de proteasas, manteniendo unas condiciones más fisiológicas • Compatible con muestras de tejido de pacientes • Bajo coste • No manipulación genética 	<ul style="list-style-type: none"> • Las condiciones astringentes de lavado no eliminan completamente las proteínas inespecíficas capturadas • La alta afinidad dificulta la elución de las proteínas capturadas • Es necesaria la purificación de TUBEs

2.2.2.2. Análisis por espectrometría de masas

Tras la purificación de las proteínas ubiquitinadas se lleva a cabo su identificación por MS. Los sitios de ubiquitinación de las proteínas ubiquitinadas purificadas pueden ser identificados por MS, gracias a la detección de aductos peptídicos derivados de la ubiquitina. La secuencia C-terminal de la ubiquitina posee una secuencia Leu⁷³-Arg⁷⁴-Gly⁷⁵-Gly⁷⁶, que se une a través del residuo de glicina-76 a los residuos de lisina de las proteínas sustrato (ver sección 2.2.1. y Figura I.13). La tripsina corta predominantemente las proteínas en el extremo C-terminal de sus residuos de lisina y arginina, exceptuando cuando el residuo siguiente es una prolina. Por tanto, las uniones peptídicas Arg-Lys y Arg-Gly de la ubiquitina, pueden ser cortadas por dicha enzima. Cuando la ubiquitina unida a una proteína es digerida por la tripsina, deja un aducto gly-gly en el residuo de lisina que modifica, generando un nuevo tipo de péptido que puede ser identificado por MS (Figura I.13). Además, la modificación por ubiquitina elimina un sitio de corte lisina en la proteína sustrato de ubiquitinación (Xu et al., 2010a; Peng et al., 2003), produciendo péptidos diferentes según su estado de ubiquitinación.

Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la mayoría de los péptidos detectados por MS no contienen residuos de lisina modificada, haciendo difícil distinguir entre proteínas ubiquitinadas, proteínas de interacción a ubiquitina (ubiquitoma) o proteínas inespecíficas (Danielsen et al., 2011), y menos aún identificar todos los sitios de ubiquitinación. Por este motivo, con el objetivo de disminuir la unión de proteínas inespecíficas sin perder las proteínas del ubiquitoma, es necesaria una buena puesta a punto del protocolo de purificación.

Para enriquecer los péptidos ubiquitinados y ayudar a su identificación por MS, actualmente existen anticuerpos que reconocen los aductos gly-gly de las lisinas de los sitios de ubiquitinación. Mediante esta técnica, los lisados celulares son digeridos con tripsina y tras esto los péptidos ubiquitinados son inmunoprecipitados por los anticuerpos gly-gly (Xu et al., 2010a), permitiendo identificar tan solo las proteínas ubiquitinadas (Figura I.13B).

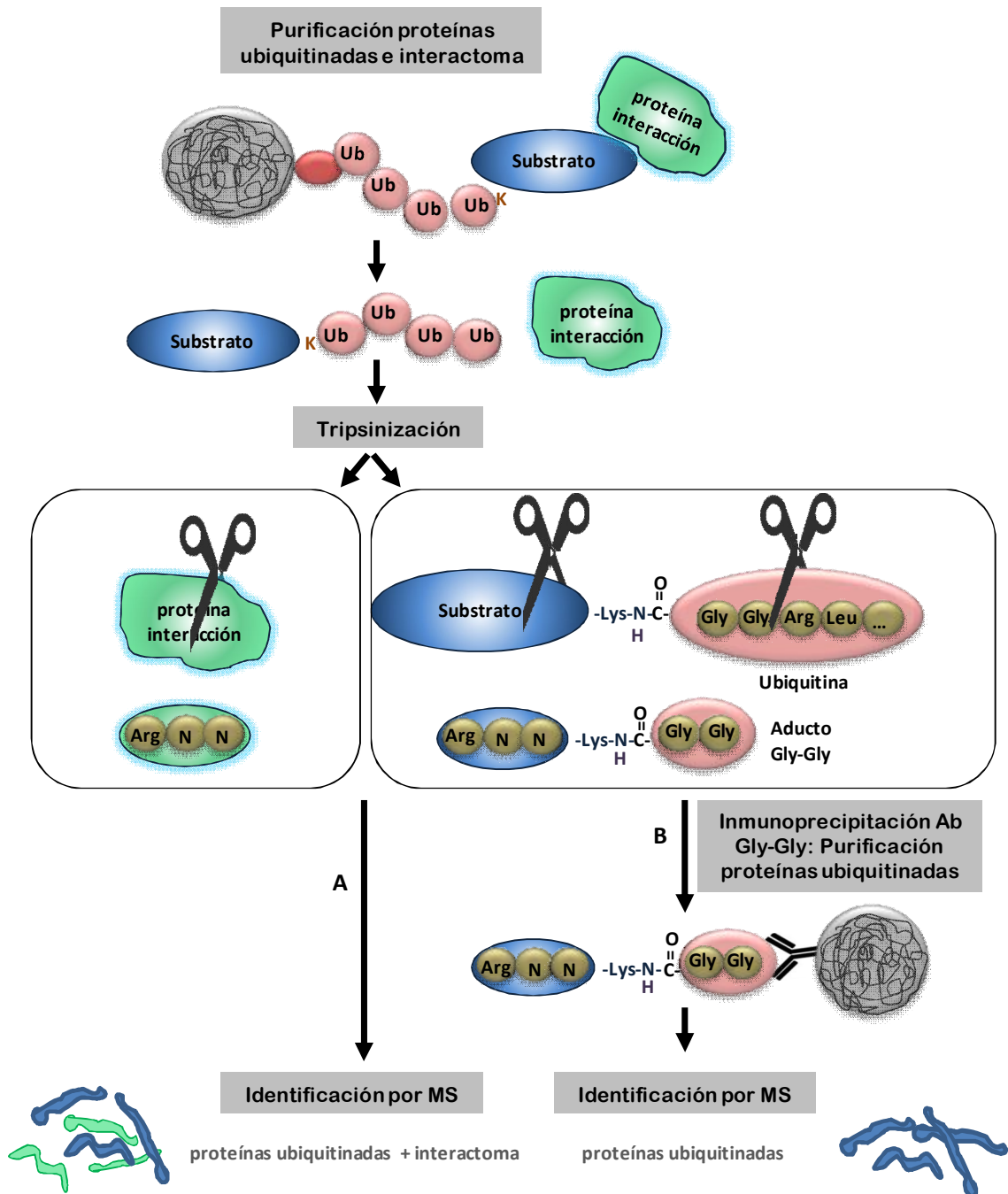


Figura I. 13. Preparación de las muestras para su identificación por MS. Las proteínas ubiquitinadas son capturadas según se ha descrito en la sección 2.2.2.1. Sin embargo otras proteínas de interacción son también co-purificadas (interactoma). Todas las proteínas presentes en la muestra son tripsinizadas para su identificación por MS. La tripsinización genera aductos gly-gly en los residuos de lisina modificados en las proteínas ubiquitinadas. **A.** Los péptidos generados provenientes de proteínas ubiquitinadas e interactoma son analizados por MS. **B.** Los péptidos que contienen aductos gly-gly pueden ser inmunoprecipitados con anticuerpos y ser identificados por MS, permitiendo discriminar entre las proteínas ubiquitinadas y su interactoma. “N” significa un aminoácido cualquiera.

2.2.3. Métodos de identificación de nuevos inhibidores del UPS

Tal y como se ha descrito anteriormente, el UPS juega un papel fundamental en la regulación de multitud de procesos esenciales. Por ello es un sistema altamente regulado y cuyo desbalance está presente en numerosas enfermedades hereditarias y adquiridas como la fibrosis quística, síndrome de Angelman y Liddle, en enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la esclerosis amiotrófica lateral, esclerosis múltiple, asma, enfermedad tiroidea autoinmune, artritis, diabetes tipo I, enfermedad inflamatoria intestinal, en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, en la pérdida de músculo esquelético y en diferentes tipos de cáncer (Chitra et al., 2012). También está implicado en enfermedades infecciosas víricas, bacterianas e infecciones causadas por protozoos como la leishmaniasis, la tripanosomiasis y la malaria.

Inicialmente la función del UPS como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer fue cuestionada debido a su esencialidad. Los primeros inhibidores de proteasoma fueron análogos de inhibidores de serina y cisteína proteasas conocidos como el MG132, que tenían una mayor estabilidad, potencia y selectividad por el proteasoma. Dichos inhibidores fueron sintetizados para estudiar el mecanismo enzimático del proteasoma y su función en la célula. Sin embargo, varios estudios mostraron que dichos compuestos producían apoptosis selectiva en líneas celulares cancerosas, por tener una capacidad proliferativa mayor que las células normales, llevando a la idea del proteasoma como diana terapéutica. Dicha idea fue confirmada con el inhibidor Bortezomib, puesto que en pacientes con cánceres hematológicos producía una toxicidad selectiva por las células cancerosas, reduciendo el tamaño del tumor, una disminución de la metástasis y un bloqueo de la angiogénesis. Así, en 2003 fue aprobado como tercer tratamiento para el mieloma múltiple por la FDA (food and drug association EEUU). Actualmente es el tratamiento de primera línea para el mieloma múltiple, ha sido aprobado como tratamiento para el linfoma de las células del manto, y está presente en cientos de ensayos clínicos, solo o en combinación con otros fármacos (Tabla AI.1). Además, otro inhibidor de proteasoma, Carfilzomib, ha sido aprobado para el mieloma múltiple refractario, hay cuatro inhibidores en distintas fases

clínicas para cáncer y enfermedades inflamatorias y siete inhibidores más en preclínica. En el ANEXO I se encuentra una descripción detallada de los diferentes inhibidores del UPS en la clínica.

Debido a la validación terapéutica del proteasoma y otros componentes como E3 ligasas y DUBs, durante los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para identificar nuevas estructuras con una mayor selectividad frente a las células diana, siendo de gran interés para la industria farmacéutica.

2.2.3.1. Proteasoma

Actualmente existen varias aproximaciones para la búsqueda de nuevos inhibidores. Estas aproximaciones suelen utilizarse en combinación para una mayor fiabilidad.

a) Ensayos enzimáticos.

Esta técnica es la más usada para medir la actividad del proteasoma *in vitro*. Péptidos cortos acoplados en la región C-terminal a marcadores fluorescentes como la 7-amino-4-metilcumarina (AMC), son utilizados como substratos específicos para cada una de las tres actividades del proteasoma (Figura I.14). Por ejemplo el péptido Suc-LLVY-AMC ha sido ampliamente utilizado para la medida de su actividad quimiotripsina. La ruptura de los péptidos por el proteasoma entre el último aminoácido y la molécula fluorescente produce la liberación del AMC, incrementando la fluorescencia a una longitud de onda determinada, que será proporcional a su actividad proteolítica (Kisselev and Goldberg, 2005) (Figura I.14).

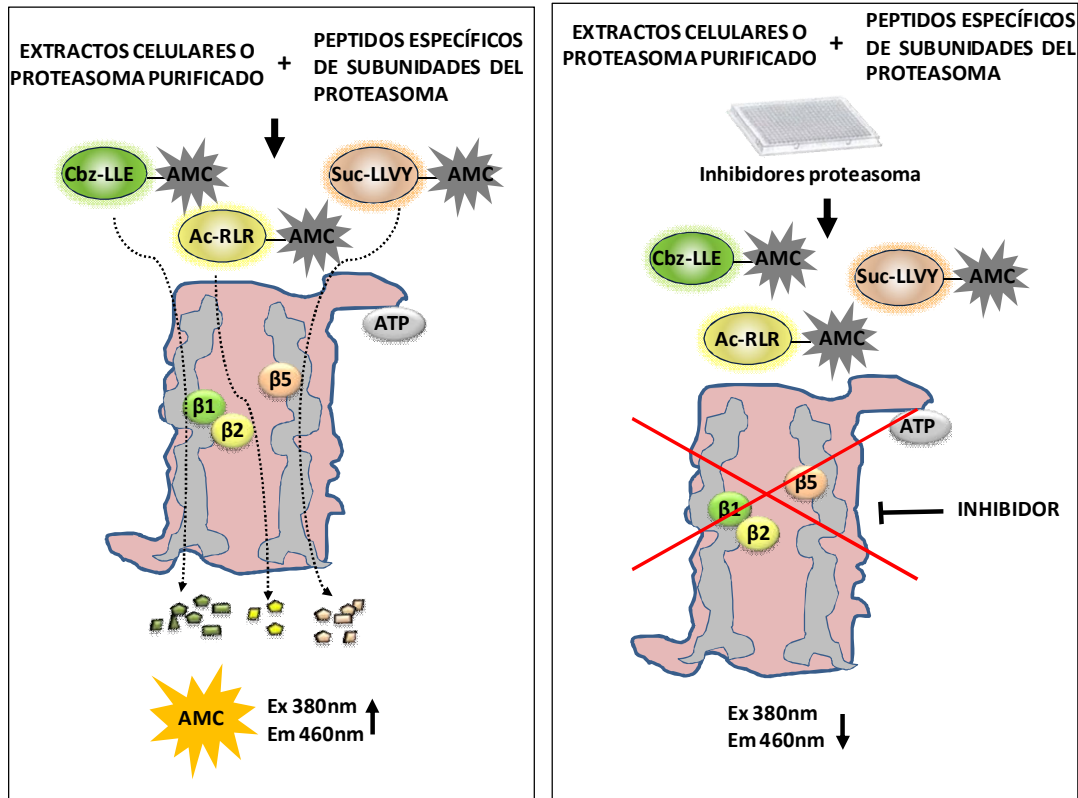


Figura I. 14. Ensayo de actividad fluorogénica para medir la actividad del proteasoma. Para medir cada una de las actividades catalíticas del proteasoma existen péptidos sustrato reconocidos por cada una de ellas. Por ejemplo Cbz-LLE es reconocido por la $\beta 1$, AC-RLR por la $\beta 2$ y Suc-LLVY por la $\beta 5$. En presencia de un lisado celular o el proteasoma purificado, los péptidos son cortados, liberando el fluoróforo AMC cuya señal puede ser medida (Ex 380 nm/ Em 460 nm). Los inhibidores del proteasoma evitarán que el sustrato específico para la subunidad que inhibe sea cortado, y por tanto no se producirá un incremento de la señal a 460 nm al no liberarse el AMC de dicho péptido.

La desventaja de esta técnica es que el AMC es una molécula muy hidrofóbica que puede interaccionar con los compuestos a testar. Además, debido a que se excita en el rango del ultravioleta, muchos de los compuestos identificados pueden ser falsos positivos o negativos (20% por autofluorescencia o “quenchers”). Por ello, aunque el AMC es el marcador más utilizado hasta el momento, existen también otros marcadores acoplados a los péptidos sustratos. Por ejemplo, la compañía Promega ha acoplado péptidos reconocidos por el proteasoma a la aminoluciferina (proteasoma-GLO). La aminoluciferina es sustrato de la luciferasa, por lo que tras el corte, la adición del reactivo de detección lleva a la producción de luminiscencia, la cual es proporcional a la actividad del proteasoma.

Los péptidos substratos comentados no pueden ser utilizados en células, por tanto la actividad del proteasoma se ensaya con extractos celulares o con proteasoma previamente purificado, aislando el proteasoma de su ambiente regulatorio celular. Los ensayos que utilizan el proteasoma purificado funcionan bien, aunque la purificación puede llevar a la disociación de la partícula 19S de la 20S alterando los resultados. Además, la cantidad de moléculas a testar disminuye considerablemente con respecto a los ensayos donde se utilizan extractos celulares. Por otro lado, los ensayos con extractos tienen el principal problema de generar un gran número de falsos positivos, ya que un porcentaje de proteasas celulares pueden también cortar el péptido, liberando la molécula fluorescente, necesitando de una confirmación posterior.

b) Ensayos celulares con substratos de proteasoma recombinantes.

Además de los ensayos de actividad con extractos, se han utilizado ensayos celulares y modelos transgénicos de ratón con el fin de medir la actividad del proteasoma *in vitro* e *in vivo*. Para ello se han utilizado substratos del proteasoma recombinantes, fusionados a proteínas reporteras como la GFP (green fluorescence protein) o la luciferasa (Dantuma et al., 2000). En condiciones celulares normales, las proteínas de fusión son rápidamente degradadas por el proteasoma, no detectándose fluorescencia o luminiscencia (Figura I.15). Sin embargo, la presencia de un inhibidor del proteasoma lleva a la acumulación de dichas proteínas y por tanto al incremento de la señal. Aunque estos métodos son útiles para encontrar nuevos inhibidores en campañas de HTS, la señal no solo depende de la inhibición, sino que también depende del balance entre síntesis/degradación de las proteínas. Esto implica a su vez otros factores celulares independientes al proteasoma, como la síntesis de la proteína recombinante. Además, el trabajo con organismos genéticamente modificados puede alterar los resultados.

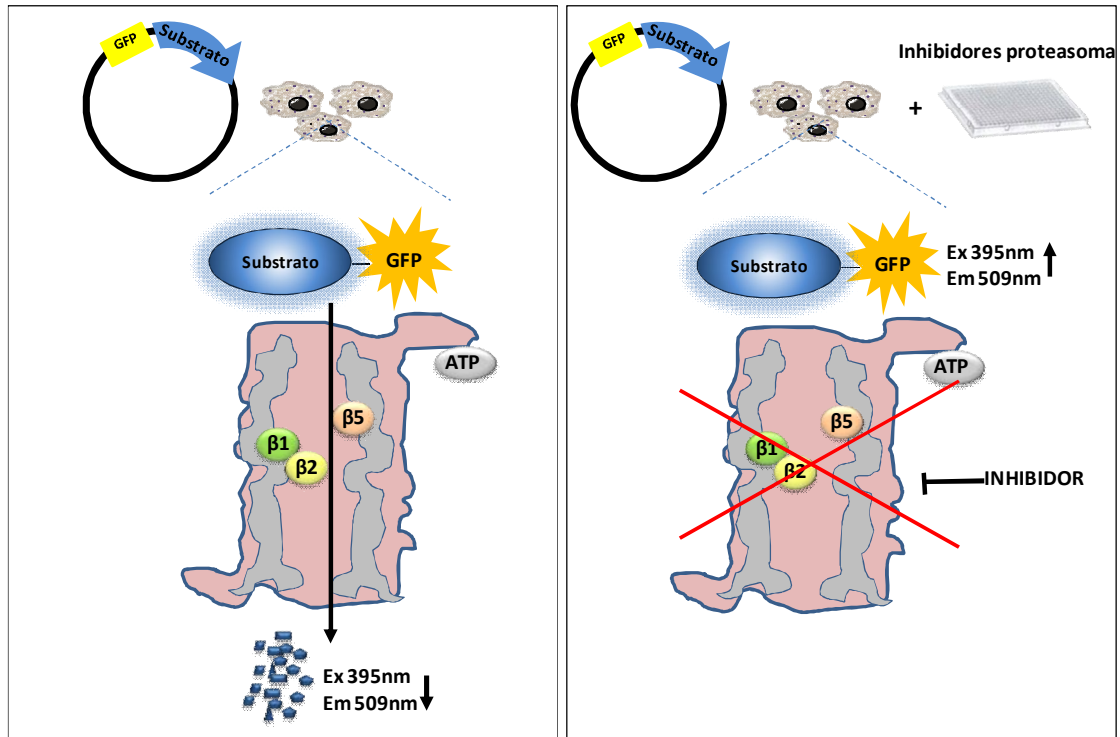


Figura I. 15. Ensayos celulares con substratos de proteasoma recombinantes. La proteína sustrato de proteasoma elegida es expresada fusionada a la proteína reportera en las células. En condiciones normales dicha proteína es reconocida y degradada por el proteasoma. En presencia de un inhibidor de proteasoma, la proteína recombinante no es degradada, produciéndose un incremento en la señal que proviene de la proteína reportera.

c) Sondas químicas de proteasoma.

Otra manera de buscar nuevos inhibidores de proteasoma en lisados celulares y en células, es mediante sondas químicas que se unen al proteasoma. Dichas sondas se unen a las subunidades catalíticas del proteasoma a través de su elemento de unión. Poseen un grupo reactivo que modifica covalentemente la región N-terminal de los residuos treonina de las subunidades catalíticas del proteasoma. Además de esto, poseen una etiqueta que permite visualizar o aislar las subunidades unidas a la sonda. Los ensayos se basan en la competición de los inhibidores con la sonda. En general, consisten en incubar las células, tejidos, extractos o proteasoma aislado, con los inhibidores, y tras esto añadir la sonda, la cual se unirá tan solo a los sitios que no estén ocupados por el inhibidor (Figura I.16). En los sitios donde la sonda no esté presente habrá una ausencia o disminución de la señal de revelado.

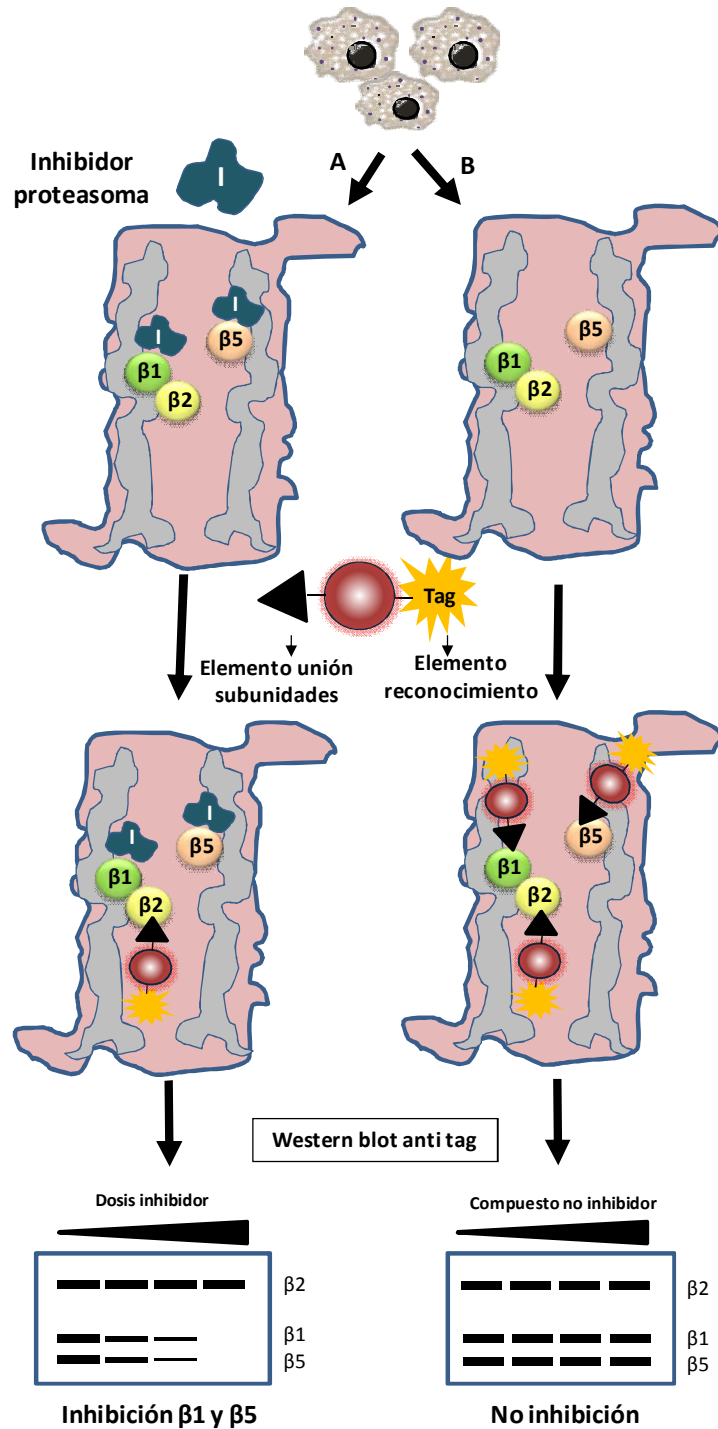


Figura I. 16. Sondas químicas de proteasoma. A. Las células o lisados celulares son preincubados con el inhibidor de proteasoma para su unión. Tras esto se añade la sonda, que se unirá a través de su elemento de unión a las subunidades catalíticas no ocupadas por el inhibidor. Las proteínas se separan por SDS-PAGE. Dependiendo de la sonda puede ser necesario realizar un Western-blot con un anticuerpo que permita visualizarla. Por ejemplo, si el inhibidor se une específicamente a las subunidades $\beta 1$ y $\beta 5$, se observará una disminución de dichas bandas proporcional a la dosis del inhibidor. B. Cuando el tratamiento se realiza con un compuesto que no es un inhibidor del proteasoma, la sonda es capaz de unirse a las tres subunidades catalíticas, visualizándose todas las bandas, independientemente de la cantidad del compuesto.

Esto ha permitido también identificar la preferencia por subunidad de inhibidores de proteasoma como el Bortezomib y el Carfilzomib, entre muchos otros. Una de las más utilizadas han sido sondas trileucina vinilsulfona como la Ahx3Leu3-vinilsulfona (Ahx) derivadas de la Epoxomicina, unidas a etiquetas como el dansyl o la biotina para su revelado por Western blot con anticuerpos anti-dansyl o biotina (Kramer et al., 2012). Existen también sondas fluorescentes como la MV151 (Verdoes et al., 2006), que permiten utilizar métodos más sencillos y directos para su visualización como el SDS/PAGE, la microscopía confocal, o la citometría de flujo, incrementando así el rendimiento para realizar campañas de HTS (Berkers et al., 2007).

d) Medida de la acumulación de proteínas ubiquitinadas.

Una forma indirecta de medir la actividad del proteasoma es medir el nivel de proteínas ubiquitinadas presente en las células tras un tratamiento, ya que la inhibición del proteasoma lleva a su acumulación. Estas proteínas ubiquitinadas pueden ser observadas por Western blot, utilizando anticuerpos específicos de proteínas reguladas por el proteasoma, como son las ciclinas o el factor de transcripción NFkB, o con un anticuerpo anti-ubiquitina (Figura 4.1C), lo cual está más extendido (Figueiredo-Pereira et al., 1994). La medida de la acumulación de proteínas ubiquitinadas no solo es válida para encontrar inhibidores del proteasoma, sino que también es útil para encontrar inhibidores de otros puntos de la vía ubiquitina proteasoma, ya que por ejemplo la inhibición de DUBs también lleva a una acumulación de proteínas ubiquitinadas (ver sección 2.2.3.3.). Sin embargo, la utilización de anticuerpos es costosa y el Western blot requiere de tiempo, no siendo aplicable en campañas de HTS.

2.2.3.2. Enzimas conjugadoras de ubiquitina

Dada la posible toxicidad de los inhibidores de proteasoma, existen también diferentes ensayos para la búsqueda de nuevos inhibidores de otros componentes de la vía (Tsvetkov et al., 2010). La mayoría de los ensayos están diseñados para

encontrar compuestos que modulen de manera selectiva uno o varios substratos de la ubiquitinación, a través de la regulación de las E3 ligasas, puesto que son los últimos efectores de la cascada. Sin embargo, también se han desarrollado ensayos para la búsqueda de inhibidores de las enzimas E1 y E2, puesto que se ha visto sus beneficios en la clínica (ANEXO I). Dichos inhibidores pueden llevar a la disminución de los niveles globales de la ubiquitinación, al tener un menor nivel de selectividad que las E3 ligasas.

a) Ensayos enzimáticos.

Los ensayos enzimáticos son con diferencia los más utilizados para la búsqueda de inhibidores.

Existen tres posibles maneras de inhibir las **enzimas E1**. Bloqueando el acceso del ATP utilizando análogos de éste, inhibir la cisteína del centro activo, o bloquear la entrada de la ubiquitina al sitio de adenilación. En el caso de las **enzimas E2** la inhibición puede producirse bloqueando la interacción con la enzima E1 o la E3, bloqueando la transferencia de la ubiquitina activada a la cisteína de la enzima E2, o inhibiendo la transferencia de la ubiquitina al sustrato. Para medir la actividad de las enzimas E1 o las E2, primeramente se ha de reproducir la reacción enzimática *in vitro* con las enzimas recombinantes, y tras esto determinar la cantidad de ubiquitina que poseen (carga de ubiquitina). La actividad de las enzimas E2 también puede medirse partiendo de la enzima unida a ubiquitina y medirse su des-conjugación.

Para la búsqueda de inhibidores de **E3 ligasas**, se han llevado a cabo un mayor número de aproximaciones (Landre et al., 2014; Tsvetkov et al., 2010), pero todas requieren de la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Puede haber inhibidores como las Nutlinas, que inhiban la unión entre la E3 ligasa con su sustrato (MDM2-p53) (Vassilev et al., 2004), o entre el sustrato y la ubiquitina. Sin embargo, debido a que los substratos de la mayoría de las E3 ligasas no han sido identificados, una de las formas más usadas para medir la inhibición de las E3 ligasas, son ensayos independientes de sustrato. Por ejemplo, midiendo su autoubiquitinación, la formación de cadenas de poliubiquitina, o viendo el efecto

de los inhibidores en el reclutamiento de proteínas adaptadoras como las RING E3 ligasas, que son nexos de unión entre las E2 y el sustrato y no poseen actividad catalítica. En los ensayos independientes de sustrato, los inhibidores encontrados pueden afectar a los diferentes sustratos ubiquitinados por la E3 ligasa diana. Cuando la inhibición debe ser específica de sustrato, esta aproximación no sería válida, debiendo realizarse ensayos que detecten la ubiquitinación de ese sustrato en particular. Para ello, se debe tener la proteína sustrato recombinante, además de las E1, E2 y E3, para llevar a cabo toda la cascada de ubiquitinación, lo cual no siempre es sencillo.

Para la medida de la carga de ubiquitina, polimerización de cadenas de ubiquitina, la interacción entre dos componentes, la ubiquitinación de las enzimas conjugadoras o de sus sustratos, etc., pueden utilizarse tanto ensayos homogéneos como heterogéneos (Tsvetkov et al., 2010; Xu et al., 2010b; Sun, 2005; Degorce et al., 2009) (Figura I.17), existiendo diversos ejemplos de ello. La diferencia entre ambos tipos de ensayos es que en los primeros todos los componentes están en una solución libre, mientras que en el segundo caso, alguno de los componentes de la reacción está inmovilizado a una placa junto con el resto de los componentes en la solución. Estos últimos, necesitan de lavados para eliminar los componentes no unidos, disminuyendo así el rendimiento.

Uno de los métodos homogéneos utilizados para medir la carga de ubiquitina es el HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) o FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Degorce et al., 2009) (Figura I.17A). En estos ensayos se mide la cercanía entre dos componentes como la ubiquitina y alguna de sus enzimas conjugadoras. Cada uno de dichos componentes está marcado con cromóforos, o poseen elementos de reconocimiento como el GST, que son reconocidos por fluoróforos comerciales. Existen numerosas posibilidades, pero en todos los casos una molécula cromófora actúa como donadora y la otra como aceptora. Cuando se excita a una determinada longitud de onda, solo cuando ambos cromóforos están lo suficientemente próximos, la energía es transferida de la donadora a la aceptora emitiendo energía que puede ser cuantificada.

El método homogéneo de Fluorescencia Polarizada (FP) también puede utilizarse para determinar la cercanía entre dos componentes. Esta técnica

requiere del marcaje de alguno de los componentes con un fluoróforo, ya que se basa en la diferencia de movimiento de un fluoróforo cuando está libre o interaccionando con otra proteína (Lea and Simeonov, 2011). Cuando el fluoróforo está en solución, se voltea continuamente emitiendo luz en diferentes planos (despolarizada), mientras que si está conjugada a una molécula larga, su rotación es mucho menor (polarizada). Si por ejemplo es la ubiquitina la que está unida al fluoróforo, la unión de la ubiquitina a cualquiera de las enzimas, incrementará la luz polarizada, y disminuirá con su hidrólisis (Figura I.17B).

Otro método homogéneo muy utilizado es la tecnología AlphaScreen como el AlphaLISA (Figura I.17C). En estos ensayos dos proteínas con etiquetas diferentes como la histidina o el GST se unen uno a una bola AlphaScreen donadora y el otro a una bola de AlphaScreen aceptora (Eglen et al., 2008). Cuando ambas bolas están lo suficientemente cerca (hasta 200 nm), debido a la interacción entre las dos proteínas, tras la excitación la bola donadora emite un singlete reactivo de oxígeno que excita a la bola aceptora, la cual emite luz a una determinada longitud de onda que puede ser detectada. La ventaja de esta técnica es que permite medir complejos más grandes que el FRET. Ambas tecnologías, HTRF y AlphaLISA han sido recientemente acopladas a las trampas de ubiquitina TUBEs (ver sección 2.2.2.1.), con el fin de medir la auto-ubiquitinación de varias E3 ligasas recombinantes de mamífero, MURF1, TRIM25, y MDM2 (Marblestone et al., 2012; Schneider et al., 2012).

En cuanto a los ensayos heterogéneos, por ejemplo se han utilizado para medir por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) la ubiquitinación de alguno de los componentes (Figura I.17D). Tras llevar a cabo la reacción de ubiquitinación, las enzimas conjugadoras o el sustrato son inmovilizados en la placa, siendo el resto de componentes lavados. Su carga en ubiquitina puede detectarse con un anticuerpo anti-ubiquitina. La ventaja de este método es su gran especificidad.

Otra manera de poder detectar la ubiquitinación es mediante ensayos de Western blot en ausencia de agentes reductores, analizando su movilidad por SDS/PAGE etc., pero con un rendimiento mucho menor.

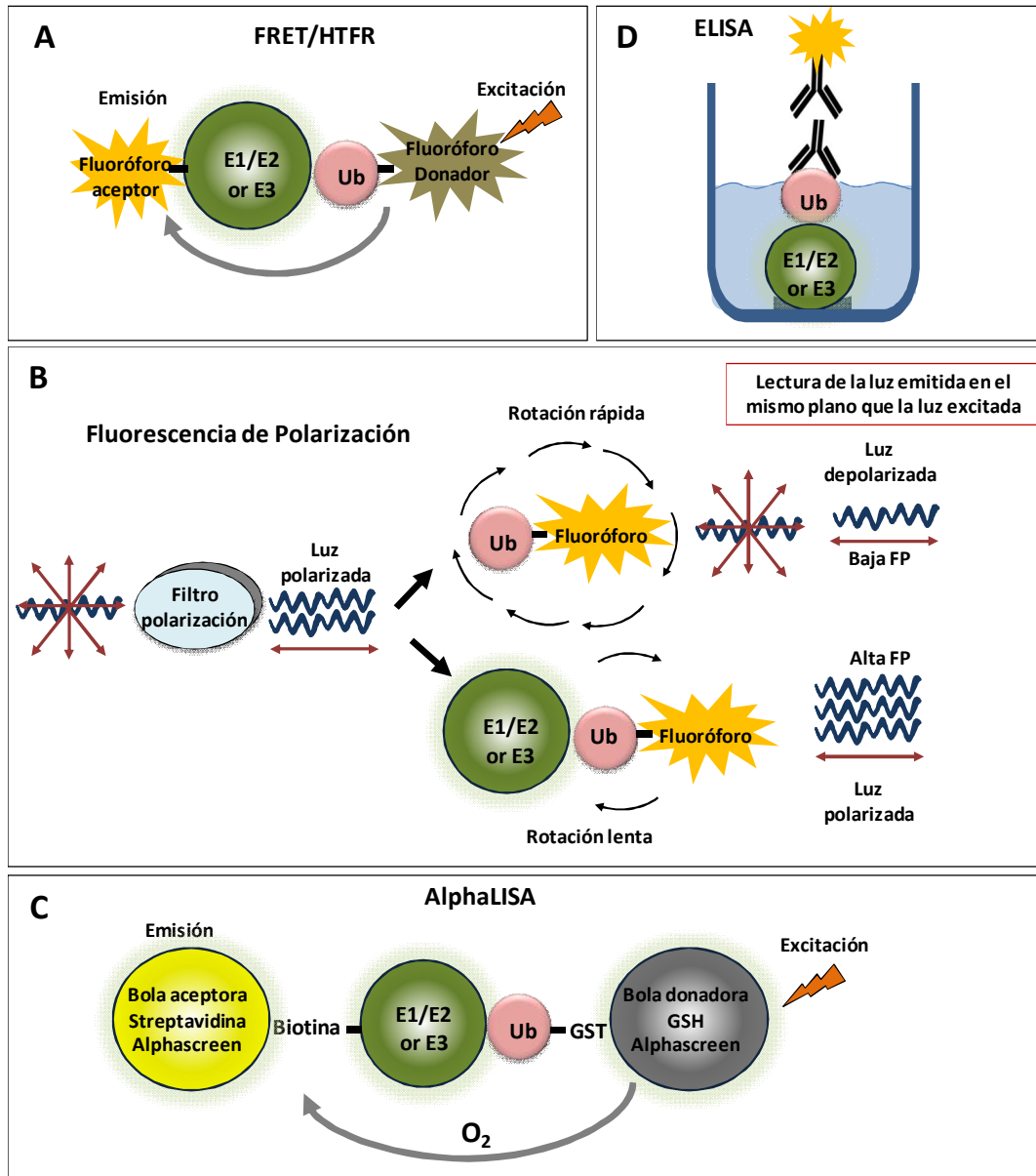


Figura I. 17. Métodos de cribado para la búsqueda de nuevos inhibidores. Ejemplo: Métodos de medida de la carga de ubiquitina. La reacción enzimática es llevada a cabo, permitiendo en ausencia de inhibición, la unión de la ubiquitina a la E1/E2 ó E3. Tras esto la carga de ubiquitina es revelada. **A. Método homogéneo FRET/HTFR.** Cada uno de ellos posee un fluoróforo unido directamente o a través de una etiqueta. Cuando la ubiquitina y la proteína recombinante E1/E2 ó E3 están cerca se produce una transferencia de energía desde el fluoróforo donador al aceptor. **B. Método homogéneo FP.** Uno de los componentes, como la ubiquitina, está unido a un fluoróforo. Cuando la ubiquitina no está unida a la proteína recombinante, el fluoróforo se voltea continuamente emitiendo luz en diferentes planos (depolarizada). Si la ubiquitina está conjugada, la rotación del fluoróforo es mucho menor (polarizada). **C. Método homogéneo AlphaLISA.** Las enzimas recombinantes E1/E2 ó E3 y la ubiquitina pueden expresarse con una etiqueta reconocida por las bolas de AlphaLISA. Cuando las bolas están cerca porque la ubiquitina está unida a la proteína, un singlete de oxígeno viaja desde la bola donadora hasta la aceptora, la cual emite a una determinada longitud de onda. **D. Método heterogéneo ELISA.** Uno de los componentes es inmovilizado en la placa de ensayo a través de una etiqueta. Tras lavar y eliminar las proteínas no unidas, la ubiquitina se revela utilizando anticuerpos específicos.

b) Ensayos celulares.

Dada la dificultad de generar todo el sistema de ubiquitinación recombinante *in vitro*, existe la necesidad de desarrollar ensayos celulares en un formato HTS, para así también identificar inhibidores activos en el ambiente celular. Por ejemplo, aprovechando la auto-ubiquitinación producida en E3 ligasas como la MDM2 y su degradación por el proteasoma, se ha llevado a cabo una campaña de HTS, utilizando células que expresaban la MDM2 unida a la luciferasa (Herman et al., 2011). En presencia de un inhibidor, la proteína MDM2 no se autoubiquitinaba y por tanto no era degradada por el proteasoma, acumulándose y generando luminiscencia. Mediante esta aproximación, los inhibidores obtenidos podían ser también inhibidores del proteasoma (Figura I.15) o de otras enzimas E1 o E2, necesitando de ensayos secundarios para deconvolucionar los compuestos positivos obtenidos. Además, otros factores independientes al UPS podrían alterar la síntesis de la proteína recombinante, identificando inhibidores inespecíficos de la E3 ligasa.

2.2.3.3. DUBs

La mayoría de las DUBs están compuestas por dominios catalíticos y de interacción a proteínas conservados en otras cisteína proteasas. El desarrollo de inhibidores de proteasas está justificado desde el punto de vista terapéutico, al estar implicadas en numerosas funciones celulares esenciales. Sin embargo, aunque se han realizado numerosas campañas de HTS basadas en la medida de la actividad catalítica, tan solo se han encontrado un número limitado de inhibidores selectivos, ya que los inhibidores más potentes interaccionan con el centro activo catalítico, el cual es común a otras proteasas celulares. A pesar de ello, las campañas de HTS basadas en DUBs continúan, ya que se ha visto que aunque es difícil, la selectividad es posible (ANEXO I) (Nicholson et al., 2014).

a) Ensayos enzimáticos.

Como fuente de DUBs en los ensayos enzimáticos pueden utilizarse lisados celulares, muestras biológicas o enzimas recombinantes.

Los ensayos para encontrar inhibidores de DUBs más utilizados se han basado en la utilización de ubiquitina conjugada a sustratos fluorogénicos, a través de una unión peptídica lineal. Este tipo de ensayos son similares a los mostrados para medir la actividad del proteasoma (Figura I.14), solo que el péptido es reconocido y cortado de forma específica por DUBs. Al igual que en los anteriores, en estos ensayos la ruptura de dicho enlace por las DUBs lleva a la liberación de la molécula fluorescente y por tanto a un incremento de la señal. La Ub-AMC (Dang et al., 1998; Mason et al., 2004) ha sido el sustrato fluorogénico más utilizado. Como se ha comentado anteriormente (ver sección 2.3.2.1.), la lectura por AMC puede generar un alto número de falsos positivos o negativos. Para evitar esto, el AMC se ha sustituido por otros fluoróforos como la rodamina 110 (Rho110) (Hassiepen et al., 2007) y la tetrametilrodamina (TAMRA), cuya excitación está desplazada al rojo, dando lugar a un menor número de artefactos (Geurink et al., 2016).

Otra forma alternativa de medir la hidrólisis, y así evitar los compuestos autofluorescentes o “quenchers”, es el revelado de la fluorescencia de la sonda mediante FP (Figura I.17B). Además de esto, para incrementar la sensibilidad del ensayo, también se utilizan ensayos acoplados como el Ub-CHOP o Ub-PLA2 (Nicholson et al., 2008). En este caso el fluoróforo es reemplazado por una enzima reportera que es inactiva cuando su amino N-terminal está unido al C-terminal de la ubiquitina. Tras el corte, la DUB libera la enzima, permitiéndola actuar sobre su sustrato y generando una señal proporcional a la actividad de la DUB. Otro ejemplo, es el ensayo DUB-GLO de la compañía Promega, muy similar al proteasoma-GLO (2.2.3.1.). En dicho ensayo, la región C-terminal de la ubiquitina está unida a la aminoluciferina (Z-RLRGG-AML).

En todos estos ensayos, además de los artefactos que se pueden producir, existe otro factor limitante, y es que no todas las DUBs son capaces de hidrolizar eficientemente la unión peptídica lineal, ya que las DUBs cortan uniones isopeptídicas y sus sustratos fisiológicos son largas cadenas polipeptídicas. Por

ello, para incrementar la relevancia fisiológica de los ensayos se han desarrollado sustratos unidos por uniones isopeptídicas a moléculas fluorescentes, como es el caso del sustrato di-ubiquitina. En este sustrato, el C-terminal de una molécula de ubiquitina está unido a la lisina de otra proteína de ubiquitina, y ambas moléculas están unidas a su vez a algún tipo de sonda para su detección. Esto además permite construir sustratos con distintos tipos de uniones isopeptídicas (K63, K11, K48, etc.). La unión entre las moléculas de ubiquitina puede detectarse por alguno de los métodos ya descritos en la Figura I.17.

c) Ensayos basados en sondas químicas.

El desarrollo de ensayos basados en sondas químicas dirigidas ha acelerado el descubrimiento y estudio de las DUBs (Ekkebus et al., 2014) (Figura I.18). En este caso, las sondas químicas poseen la proteína ubiquitina como elemento de unión a las DUBs, un elemento de reconocimiento que permite la captura o la visualización, y un grupo reactivo que reacciona con el centro activo de la enzima una vez unidas. Las sondas pueden ser utilizadas para identificar inhibidores en su ambiente fisiológico celular, así como para estudiar su selectividad y especificidad. Además han permitido determinar la selectividad de diferentes DUBs frente a varios tipos de cadena de ubiquitina (McGouran et al., 2013).

Existen diferentes tipos de sondas. La HA-UbVME y la HA-ubBr₂ han sido unas de las sondas más utilizadas. Ambas han mostrado tener una unión específica a un amplio rango de DUBs y no tener reactividad cruzada frente a otras proteasas (Borodovsky et al., 2002; Hemelaar et al., 2004). Por ejemplo, han sido de gran utilidad para estudiar la especificidad de inhibidores de DUBs. En este caso, las células o extractos celulares son tratados con el inhibidor y tras ello con la sonda. La sonda se une tan solo a aquellas DUBs a las que el inhibidor no se ha unido previamente, siendo visualizadas por Western blot y/o caracterizadas por MS.

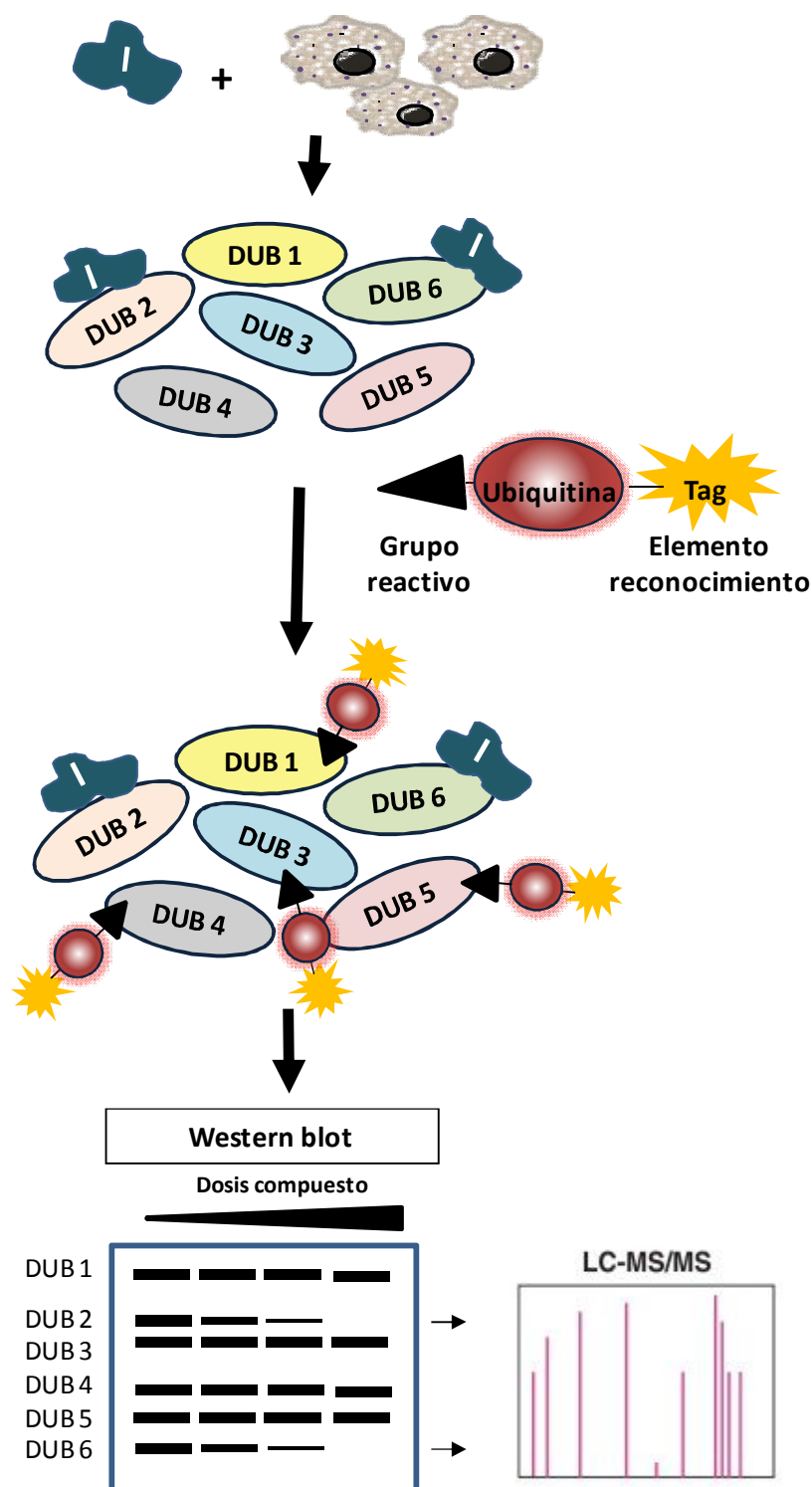


Figura I. 18. Sondas químicas de DUBs. En estos ensayos, las células o extractos celulares son tratados con el inhibidor. Tras esto se añade la sonda química, que reconoce específicamente las DUBs que no han sido previamente unidas al inhibidor, gracias a su residuo de ubiquitina. Las DUBs se separan por SDS-PAGE. Dependiendo de la sonda puede ser necesario realizar un Western-blot con un anticuerpo anti-etiqueta. Las bandas que desaparecen pertenecen a las DUBs reconocidas por el inhibidor. Estas DUBs pueden ser luego identificadas por MS.

Inhibidores no específicos como el PR619 llevan a la desaparición de un gran número de bandas correspondientes a las diferentes DUBs, mientras que inhibidores selectivos como el P22077 tan solo evitan la visualización de determinadas bandas, como la correspondiente a la DUB USP7 (Altun et al., 2011; de Jong et al., 2012). Existen también sondas químicas dirigidas unidas a fluoróforos que permiten detectar las DUBs de una forma rápida y sencilla, con mayor sensibilidad y resolución y con una mínima manipulación de la célula. El potencial de las sondas fluorescentes es grande ya que permite realizar ensayos en paralelo con múltiples fluoróforos (multiplexing), medir la intensidad de fluorescencia directamente en gel, realizar ensayos de localización por microscopía utilizando células intactas, etc. (McGouran et al., 2012).

La desventaja de esta técnica es que debido a la naturaleza covalente de las sondas químicas, su realización no es sencilla, requiriendo ser cuidadosos con los tiempos de incubación, y una elevada concentración del inhibidor. Además, debido a su mecanismo catalítico, las DUBs del tipo metaloproteasas son difíciles de marcar. Por otro lado, la técnica no permite el análisis de un número elevado de compuestos.

d) Medida de la acumulación de proteínas ubiquitinadas.

El tratamiento con inhibidores de DUBs lleva a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en extractos celulares, que pueden ser visualizadas mediante Western blot con un anticuerpo anti-ubiquitina. Por ejemplo, el inhibidor b-AP15 bloquea la actividad des-ubiquitinasa de dos DUBs asociadas al proteasoma 19S, la UCHL5 y la USP14, produciendo una acumulación de proteínas ubiquitinadas (Wang et al., 2015). Dicha acumulación es producida tanto por inhibidores inespecíficos como el PR619, como por específicos como el P22077. La inhibición con ambos compuestos llevan a la acumulación de proteínas ubiquitinadas fundamentalmente de tipo K48, lo que ha podido determinarse gracias a la captura con TUBEs (Altun et al., 2011). Al igual que sucedía en la búsqueda de inhibidores de proteasoma, la utilización de ésta técnica no puede ser fácilmente aplicable para ensayar un gran número de compuestos.

2.3. EL UPS COMO ANTIMALÁRICO

P. falciparum experimenta varias diferenciaciones celulares a través de su ciclo de vida, requiriendo diferentes proteínas en cada una de sus etapas. Análisis bioinformáticos, proteómicos y del transcriptoma de *P. falciparum* han mostrado que, a pesar de que se produce un gran cambio en los niveles de ARNm (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2004) de los distintos genes a través del ciclo de vida, la regulación transcripcional parece ser bastante rígida. Distintas evidencias apuntan a que *Plasmodium* no sigue un modelo transcripcional clásico, ya que no se han encontrado un gran número de motivos de regulación ni de reguladores de la transcripción (Coulson et al., 2004; Ganesan et al., 2008). Dichos cambios podrían estar regulados por mecanismos postranscripcionales y/o postraduccionales como la fosforilación, acetilación, metilación, lipidación y ubiquitinación. Las modificaciones postraduccionales además de reversibles, son mecanismos que median la respuesta celular de una forma rápida ante diferentes estímulos, permitiendo al organismo adaptarse al medio en todo momento. A pesar de la importancia del UPS, como elemento regulatorio del ciclo de vida del parásito y por tanto para el descubrimiento de nuevos fármacos, su conocimiento en *P. falciparum* es aún muy limitado, no siendo hasta hace menos de una década cuando comenzaron los primeros estudios para su elucidación.

2.3.1. Componentes del UPS en *P. falciparum*

Los primeros estudios realizados fueron análisis computacionales comparativos basados en la búsqueda de dominios estructurales o funcionales relacionados con el UPS. El objetivo era identificar los distintos componentes del UPS en las especies de *Plasmodium*. Así, se identificaron 114 proteínas putativas que contenían uno de los 24 dominios PFAM característicos del UPS (Ponts et al., 2008). Entre ellas, se encontraron 3 genes precursores de poli-ubiquitina, los homólogos de NEDD8, SUMO, HUB1, URM1 y ATG8, 8 enzimas activadoras E1, 14 enzimas conjugadoras E2, 54 enzimas E3 ubiquitina ligasas y 29 DUBs (Hamilton et al., 2014). También fueron encontrados ortólogos a las proteínas

transportadoras RAD23, DSK y DD11 (ver sección 2.2.1.). Sin embargo, la implicación de la mayoría de las proteínas del UPS aún no ha sido confirmada experimentalmente, y la información sobre su funcionalidad en *P. falciparum* es muy limitada.

a) Ubiquitina y otros modificadores de la familia ubiquitina.

P. falciparum posee un gen precursor de poliubiquitina que comprende 5 repeticiones de ubiquitina dispuestos en tándem y con un marco abierto de lectura (Horrocks and Newbold, 2000). Dicho gen posee un grado de identidad con otras especies eucariotas, y es expresado en todas las etapas del ciclo de vida del parásito, aunque su pico de expresión se produce en la etapa intraeritrocítica (Bozdech et al., 2003; Le Roch et al., 2003). Además se han identificado dos genes precursores adicionales que están fusionados a las proteínas ribosómicas L40 y S27a (Ponts et al., 2008) y que también son expresadas a lo largo de todo su ciclo de vida (Bozdech et al., 2003).

En cuanto a otras proteínas conjugadoras de la familia ubiquitina, se ha visto que la conjugación con SUMO tiene un papel importante en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo (Reiter et al., 2013), y que ATG8 está implicado en la autofagia y en la biogénesis del apicoplasto (Tomlins et al., 2013). Las funciones de NEDD8, URM1 y HUB1 aún son desconocidas, aunque debido a su homología se piensa que podrían tener papeles similares a los que tienen en otros eucariotas. Por ejemplo, NEDD8 podría tener un papel esencial en la progresión del ciclo celular.

b) Enzimas de conjugación E1, E2 y E3.

El grado de homología de los dominios del UPS en 13 eucariotas diferentes (Ponts et al., 2008), mostró que el dominio UBA de las **enzimas activadoras E1** de *P. falciparum* posee un alto grado de conservación con respecto a otras especies. Tal y como se ha comentado anteriormente, dicho dominio se encuentra en las proteínas de transporte RAD23, DSK2 y DD1.

Las **enzimas conjugadoras E2** también muestran una alta conservación con respecto a otras proteínas eucariotas. Se ha visto que los niveles del ARNm de 9 de las 14 proteínas identificadas *in silico*, cambian a lo largo del ciclo intraeritrocítico, pudiendo por tanto existir un control de la ubiquitinación dependiente de la etapa (Ponts et al., 2008). La *PfUBC13*, una enzima E2, es una de las pocas proteínas del UPS validadas experimentalmente (Philip and Haystead, 2007). Su actividad es regulada por la proteína kinasa *PfPK9* y en otros organismos regula procesos como la reparación del ADN y la progresión mitótica (Laine et al., 2006), mediante la adición de cadenas de poliubiquitina K63.

Las **enzimas E3 ligasas** por el contrario, son enzimas muy poco conservadas, puesto que son las que poseen la especificidad por el sustrato. Entre las proteínas encontradas *in silico*, hay proteínas pertenecientes a las familias E3 HECT, RING y U-box, algunas de ellas con funciones clave en otros eucariotas como la ligasa SKP1-cullin-Fbox o el APC, implicadas en el ciclo celular (Ponts et al., 2008; Hamilton et al., 2014).

En 2011, el laboratorio de Karine Le Roch (Ponts et al., 2011) llevó a cabo la purificación del ubiquitoma del parásito en las etapas intraeritrocíticas, mediante la inmunoprecipitación de las proteínas ubiquitinadas con un anticuerpo anti-ubiquitina (Figura I.11B) y su identificación por MS. Algunas de las proteínas encontradas fueron la E2 homóloga a MMS2, y la E3 ubiquitina ligasa UFD2, perteneciente al sistema ERAD. Hasta el momento dicho sistema es el único cuya regulación por el UPS ha sido validado en *P. falciparum*. La función de los componentes ERAD del UPS, *PfUBA1*, *PfUBC7* y *PfHRD1* han sido confirmados experimentalmente. En base a estos resultados, se cree que el sistema ERAD del parásito podría funcionar de manera similar a humanos y levaduras (Figura I.19) (Chung et al., 2012).

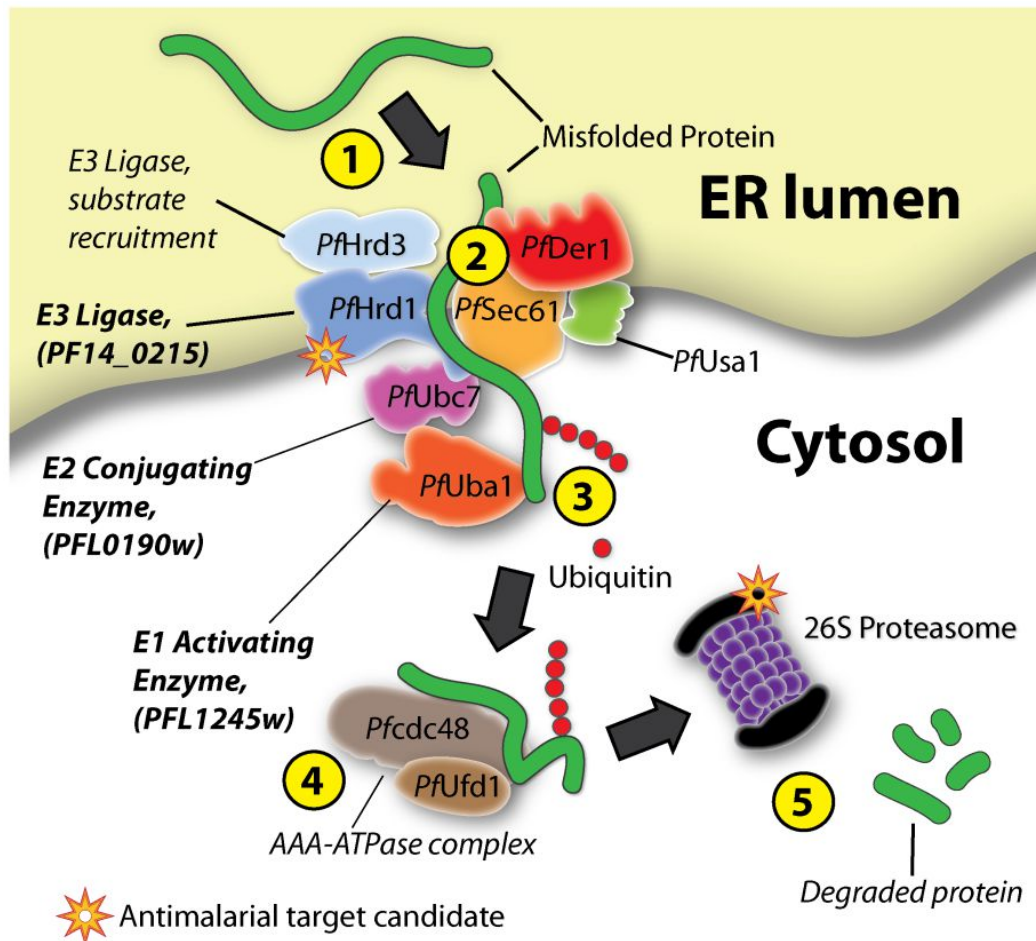


Figura I. 19. Modelo del control de calidad de proteínas ERAD en *P. falciparum*. Al igual que sucede en el humano y en levaduras, los componentes del sistema ERAD de *P. falciparum* podrían reconocer las proteínas mal plegadas del lumen del ER para llevarlas a degradar al citosol por el proteasoma. Las proteínas mal plegadas son reconocidas y reclutadas por el complejo ERAD (1), que se encuentra insertado en la membrana del ER formando un poro (2). Las proteínas son retrotranslocadas y poliubiquitinadas por los componentes del UPS: E1 PfUba1 (PFL1245w), E2 PfUbc7 (PFL0190w), y la E3 ligase PfHrd1 (PF14_0215) (3). Las proteínas poliubiquitinadas son extraídas y dirigidas al proteasoma por el complejo CDC48/UFD1 (4). Finalmente las proteínas son degradadas por el proteasoma (5). Fuente: Chung et al., 2012

Sin embargo, análisis bioinformáticos señalan que *P. falciparum* podría carecer de algunos componentes presentes en humanos (Figura I.20) (Harbut et al., 2012).

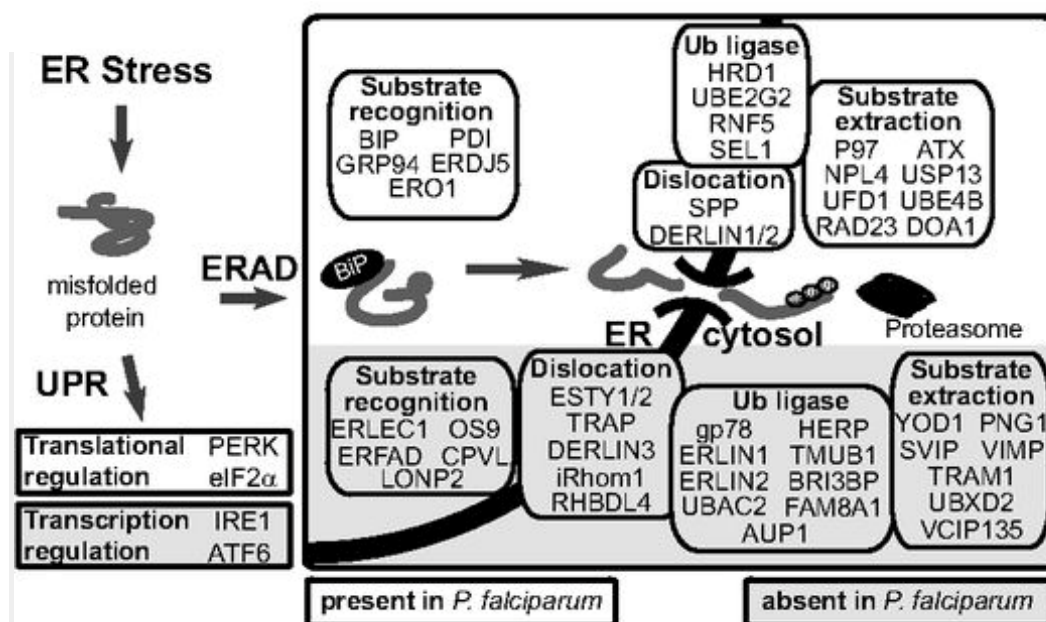


Figura I. 20. Análisis bioinformático de los componentes ERAD de *P. falciparum*. Los componentes del sistema ERAD no identificados en *P. falciparum* se encuentran sombreados, mientras que los ortólogos encontrados están en color blanco. Fuente: Harbut et al., 2012

Posteriormente a finales de 2015 y paralelamente a nuestro trabajo, Wang et al. (Wang et al., 2015) desarrollaron un nuevo método de purificación del proteasoma 26S de *P. falciparum*. Para ello se expresó el dominio PfUBL de la proteína PfRAD23, que interacciona con el proteasoma del parásito, fusionada con GST. También se expresó la proteína PfUIM2 fusionada a 6xHIS para la elución del proteasoma, puesto que dicha proteína reconoce los dominios UBL (Figura I.21). Mediante este protocolo, no solo se caracterizó el proteasoma, también se identificaron por MS otras proteínas de conjugación que copurificaban con el proteasoma. Entre ellas la RAD23, DSK2, la enzima activadora E1 (PFL1245w), la E2 UBC13 y la E2 UBC PFL0190w.

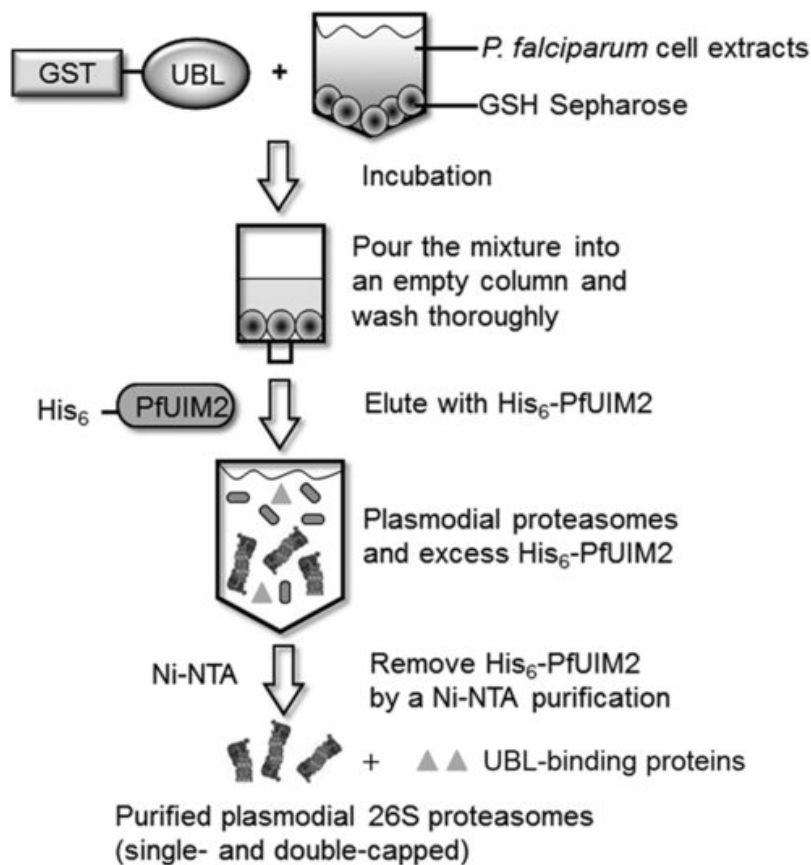


Figura I. 21. Protocolo de purificación del proteasoma mediante dominios UBL. La trampa GST-UBL se incuba con extractos celulares de *P. falciparum* y bolas de sefarosa-glutination. El dominio UBL de la trampa reconoce el proteasoma del parásito y las bolas de glutación se unen al GST de la trampa, permitiendo la precipitación del proteasoma capturado. Tras centrifugar y lavar, el proteasoma es eluido gracias a la trampa 6xHIS-UIM2, que se une a los dominios UBL de la primera trampa, liberando el proteasoma. Para eliminar las trampas presentes en la muestra se realiza una purificación Ni-NTA, que reconoce la cola 6xHIS. Fuente: Wang et al., 2015

c) DUBs.

Al igual que sucede con las E3 ligasas, la mayoría de las DUBs de *P. falciparum* también poseen una baja homología con su homólogo humano, pudiendo ser buenas dianas terapéuticas. Aunque algunas DUBs des-conjugan las cadenas de poliubiquitina de manera no específica, la mayoría tienen especificidad por sustrato. Los análisis *in silico* han revelado miembros de las 5 familias de DUBs, siendo las metaloproteasas las más divergentes (ver sección 2.2.1. y Figura I.7). Entre las DUBs encontradas en los estudios de MS anteriormente comentados, hay algunas que forman parte del proteasoma, como la proteína RPN11 de la

subunidad 19S, y otras que interaccionan con el proteasoma como la USP14 (Ponts et al., 2011). La *PfUSP14* ha sido además validada experimentalmente (Wang et al., 2015). Se ha visto que su actividad cisteína proteasa difiere de su ortólogo humano, puesto que aunque la interacción con el proteasoma incrementa su actividad, también posee actividad des-ubiquitinasa en ausencia de éste.

Otras DUBs identificadas y caracterizadas experimentalmente en otros trabajos, gracias al uso de sondas químicas ub-VME (ver sección 2.2.3.3.) y un análisis posterior por MS, fueron la proteína *PfUCH54*, homóloga de la UCH37 humana, y la *PfUCHL3*. La *PfUCH54* ha mostrado tener actividad des-ubiquitinasa y des-needilasa, a diferencia de su ortólogo humano (Artavanis-Tsakonas et al., 2006). En cuanto a la *PfUCHL3*, también posee ambas actividades, habiéndose caracterizado su especificidad y su estructura cristalográfica (Frickel et al., 2007; Artavanis-Tsakonas et al., 2010).

d) Proteasoma

La acumulación de proteínas ubiquitinadas tras el tratamiento del parásito con inhibidores de proteasoma humano, sugirió la presencia del proteasoma de *P. falciparum* y su papel en la degradación de proteínas. Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 5$ del proteasoma del parásito, fueron observadas experimentalmente en el citoplasma y núcleo en las etapas intraeritrocíticas de trofozoito y esquizonte (Aminake et al., 2011), coincidiendo con el pico de ubiquitinación observado en dichas etapas (Ponts et al., 2011).

Tras esto, análisis *in silico* revelaron la presencia de proteínas homólogas de todas las subunidades del proteasoma 26S en *P. falciparum*, con un alto nivel de conservación (Aminake et al., 2012). Además, se identificó *in silico* el homólogo del activador PA28 (11S), que mostró tener una identidad del 33%.

En el estudio de proteómica realizado por *Ponts et al.* (Ponts et al., 2011) se detectaron todas las subunidades del 20S, así como varias de las subunidades del 19S, aunque la mayoría no fueron consideradas como enriquecidas en su análisis. Por su parte *Wang et al.* (Wang et al., 2015) identificaron en esquizontes todas las

subunidades del proteasoma previamente identificadas *in silico*, incluyendo las del 19S, con excepción de la RPN15. Además, en dicho análisis proteómico se identificaron también las proteínas reguladoras PA28 y P27.

Finalmente, el proteasoma de *P. falciparum* ha sido purificado por cromatografía y recientemente se ha resuelto su estructura por Cryo-EM (electron cryo-microscopy) (Li et al., 2016b; Li et al., 2016a). Las diferencias con respecto al proteasoma humano, así como la especificidad por el sustrato, se encuentran descritas en la sección 2.3.3. (Figura I.25).

2.3.2. Proteínas reguladas por el UPS en *P. falciparum*

El conocimiento de las proteínas y vías reguladas por el UPS, puede llegar a ser de vital importancia para el descubrimiento de nuevos antimaláricos que actúen a través de éste. Sin embargo, existe muy poca información al respecto, posiblemente debido a las dificultades para aislar las proteínas ubiquitinadas ya comentadas.

Varias proteínas sustratos de ubiquitinación fueron identificadas mediante estudios individuales, observándose la ubiquitinación de proteínas como la actina (Field et al., 1993) o la histona H2B (Trelle et al., 2009). También se ha descrito la degradación de la proteína fosfoetanolamina metiltransferasa a través del proteasoma de *P. falciparum*, en presencia de clorina (Witola and Ben Mamoun, 2007). Sin embargo hasta nuestro trabajo, tan solo se había realizado un análisis global para identificar proteínas ubiquitinadas en *P. falciparum*, en las distintas etapas intraeritrocíticas (Ponts et al., 2011). En este trabajo, con el fin de identificar las posibles proteínas ubiquitinadas en *P. falciparum*, se realizaron búsquedas *in silico* de posibles sitios de ubiquitinación, utilizando dos algoritmos de predicción, *UbPred* (Radivojac et al., 2010) y *UbiPred* (Tung and Ho, 2008). *UbPred* busca regiones desordenadas dentro de las proteínas para predecir sitios de ubiquitinación, mientras que *UbiPred* está basado en las propiedades fisicoquímicas de determinadas secuencias para predecir sitios de ubiquitinación. Así, *UbPred* identificó 5036 proteínas potenciales de ser ubiquitinadas de las 5446

proteínas totales que contiene al parásito, mientras que *UbiPred* identificó 2077. A pesar de la discrepancia obtenida, lo que se observó es que *P. falciparum* podría poseer más proteínas putativas susceptibles de ubiquitinación que otras especies eucariotas, aunque esto podría deberse también a que la lisina es el segundo aminoácido más abundante en el parásito.

Además, *Ponts et al.* identificaron experimentalmente por MS un total de 437 proteínas ubiquitinadas con diferentes tipos de cadenas. En la etapa de esquizontes se encontró un mayor número de proteínas ubiquitinadas, siendo muchas de ellas específicas de dicha etapa.

Varios procesos se vieron regulados por el UPS en el parásito. Los más representados fueron la traducción, el UPS, la regulación de la expresión génica, el metabolismo y transcripción del ARN, y las chaperonas y el plegado de proteínas (Figura I.22). En cuanto al tipo de cadenas ubiquitinadas, se encontraron la unión K6, K11, K48 y K63 posiblemente por ser las más abundantes.

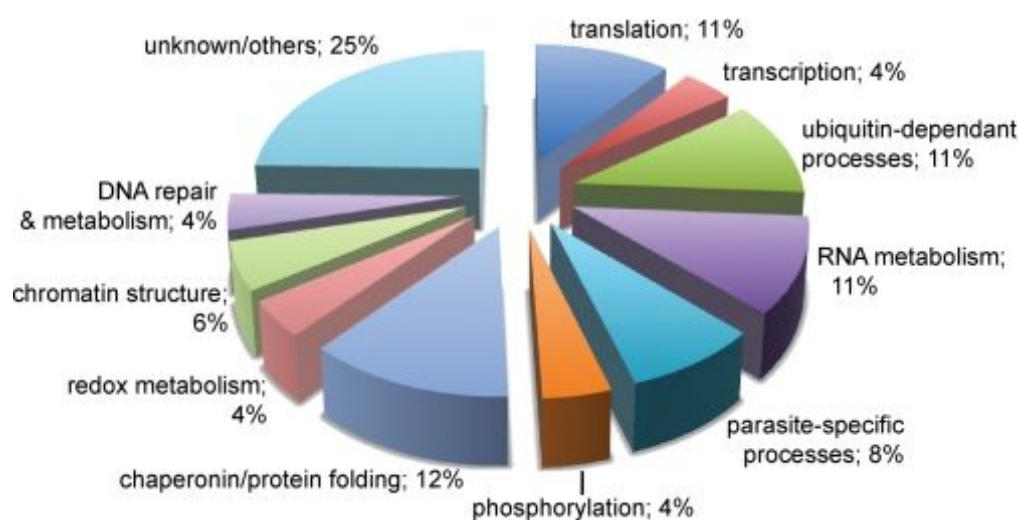


Figura I. 22. Procesos regulados por el UPS en *P. falciparum* según *Ponts et al.* 2011. Las proteínas identificadas en el estudio fueron clasificadas de acuerdo a su función, y expresadas como un porcentaje respecto al total de proteínas identificadas en el estudio. Fuente: *Ponts et al.*, 2011

Por su parte *Wang et al.* (Wang et al., 2015), paralelamente a nuestro trabajo, purificaron el proteasoma 26S mediante los dominios *PfUBL-GST* (Figura I.21), copurificando las proteínas reguladas por éste en esquizontes aislados. Así, se

identificaron 274 proteínas implicadas en el plegado de proteínas, la traducción, la regulación redox, proteólisis, glicolisis, y las interacciones entre el parásito y el hospedador (Figura I.23).

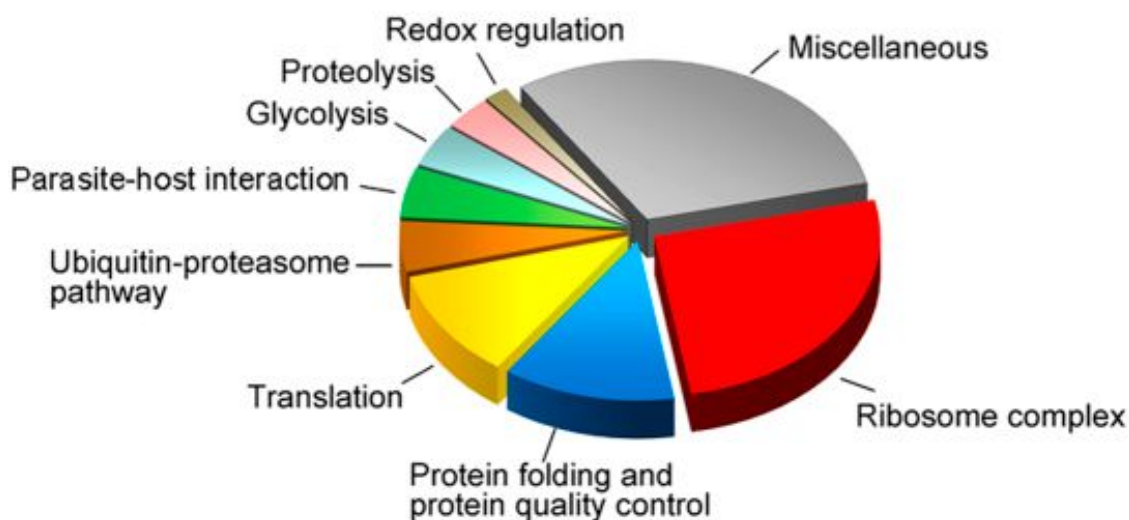


Figura I. 23. Procesos regulados por el proteasoma en *P. falciparum* según Wang et al. 2015. Clasificación de las proteínas co-purificadas con el proteasoma de acuerdo a los procesos biológicos en los cuales están implicadas en *P. falciparum*. Fuente: Wang et al., 2015

2.3.3. UPS como antimalárico

a) Inhibidores del proteasoma

Debido al papel esencial que juega el UPS en otros eucariotas, no era de extrañar que la inhibición del proteasoma de *P. falciparum* llevase a la inhibición de su crecimiento. Tras los resultados obtenidos con inhibidores de proteasoma en especies de *Trypanosoma* y *Entamoeba*, en 1998 por primera vez se vio el efecto producido por un inhibidor de proteasoma, la Lactacistina, en *P. berghei*, *P. yoelii* y *P. falciparum* (Gantt et al., 1998). La Lactacistina es una β -lactona y un metabolito natural de *Streptomyces*, que se une de manera irreversible a las subunidades β catalíticas del proteasoma, no inhibiendo otras proteasas conocidas (Fenteany et al., 1995). El tratamiento con dicho compuesto, produjo la inhibición del crecimiento del parásito en el momento de la iniciación de la replicación del ADN

de una forma rápida, coincidiendo con el momento donde se produce una mayor ubiquitinación (Ponts et al., 2011).

Tras la Lactacistina, otros inhibidores de proteasoma fueron probados en distintas fases del ciclo de *P. falciparum* y en diversas cepas. Entre ellos están la Clasto-Lactacistina β lactona (metabolito de la Lactacistina), la Gliotoxina y el Tioestrepton, que son además inhibidores de otros procesos celulares, el MG132, el MG115, el Marizomib, la Epoxomicina, el Bortezomib y sus análogos MLN-273 y ZL3B (Hatabu et al., 2006; Gantt et al., 1998; Reynolds et al., 2007; Kreidenweiss et al., 2008; Prudhomme et al., 2008; Aminake et al., 2011; Lindenthal et al., 2005; Czesny et al., 2009), así como péptidos fluoruros de sulfonilo como el PW28 (Tschan et al., 2013) (ANEXO I). El tratamiento con inhibidores de proteasoma producían una acumulación de proteínas ubiquitinadas e inhibían el crecimiento del parásito *in vitro* de forma rápida, algunos incluso a concentraciones nanomolares. Su acción frente a cepas resistentes a antimaláricos conocidos como la Cloroquina o Pirimetamina también fue confirmada, pudiendo ser utilizados solos o en combinación con otros antimaláricos, al poseer un mecanismo de acción diferente respecto a éstos. Además, se ha visto que los compuestos Artemisinina y derivados, y los inhibidores de proteasoma son sinérgicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Dogovski et al., 2015).

Compuestos como la Lactacistina y el MLN273 mostraron además su eficacia *in vitro* en etapas hepáticas a concentraciones micromolares. El MG132, la Epoxomicina y los péptidos fluoruros también mostraron su eficacia en el estadio de gametocitos, lo que es de particular importancia para evitar la transmisión de la enfermedad.

En cuanto a la actividad *in vivo* de los inhibidores de proteasoma, varios compuestos como la Lactacistina, el Marizomib, el PW28 (Tschan et al., 2013) o el Calfizomib fueron testados, observándose una reducción de la parasitemia en los animales infectados (Li et al., 2012). Sin embargo, junto con la inhibición del proteasoma del parásito se produce también la inhibición del proteasoma del hospedador, dándose cierta toxicidad *in vivo* y una ventana terapéutica pequeña con los inhibidores testados hasta el momento. Además, se ha visto que aunque a

dosis bajas los inhibidores son capaces de disminuir el crecimiento del parásito, es necesaria la exposición a altas concentraciones o incrementar el tiempo del tratamiento, para que se produzca la muerte del parásito y no se produzca recrudescencia. Esto podría ser debido a que su exposición no fuese suficiente por problemas de estabilidad del compuesto (PK), o a que aunque los inhibidores son covalentes, se produce una síntesis de novo del proteasoma que permite recuperar su actividad.

La epoxiquetona PR3 fue el primer inhibidor de proteasoma que no mostró toxicidad en el hospedador. Por primera vez se mostró que la inhibición del proteasoma de *P. falciparum* en etapas intraeritrocíticas no siempre sucede por la inhibición de las mismas subunidades β que en mamífero, pudiendo haber diferencias en cuanto a selectividad (Li et al., 2012). Esta epoxiquetona aunque era capaz de inhibir la subunidad quimiotripsina $\beta 5$ del proteasoma humano, no era capaz de inhibir la subunidad $\beta 2$ humana. En mamífero, se ha mostrado que la sola inhibición de la subunidad $\beta 5$ no es suficiente para una completa inhibición del crecimiento en células cancerosas, sino que se requiere la coinhibición de $\beta 5$ con $\beta 2$ y/o $\beta 1$ (Kisselev et al., 2006). Por tanto, inhibidores que coinhiban todas las subunidades catalíticas en *P. falciparum*, pero que solo inhiban una subunidad catalítica en el hospedador, podrían ser antimaláricos de baja toxicidad. El compuesto PR3 fue testado *in vivo*, mostrando una reducción de la parasitemia sin mostrar toxicidad. Sin embargo, no fue capaz de eliminar completamente el parásito del ratón al final del tratamiento, posiblemente por su corta vida media y su consecuente degradación en sangre.

En un estudio posterior, el mismo grupo describió las diferencias de interacción de los inhibidores con el proteasoma del parásito con respecto al del hospedador, así como las diferencias de selectividad por subunidad de los inhibidores en *P. falciparum* y en el humano (Li et al., 2014). Para ello, se utilizaron inhibidores específicos de cada una de las subunidades del proteasoma humano, NC001 ($\beta 1$ selectivo), LU102 ($\beta 2$ selectivo) y NC005 ($\beta 5$ selectivo). Los tratamientos se llevaron a cabo durante tiempos cortos, retirándose el compuesto tras el tratamiento para determinar su efecto en las fases específicas del ciclo. Además, para ver los sitios catalíticos afectados por dichos inhibidores se diseñó y

sintetizó una sonda fluorescente (BMV037) que se une covalentemente a las tres subunidades catalíticas del proteasoma del parásito, ya que las utilizadas hasta el momento para células de mamífero (MV151) no reconocían las subunidades $\beta 1$ (Figura I.16). Así se observó, que tan solo el inhibidor específico de $\beta 2$ (actividad tripsina) en humano, lo era también de *P. falciparum*, aunque a altas concentraciones inhibía también la $\beta 5$ y $\beta 1$ del parásito. El inhibidor específico de $\beta 5$ (actividad quimiotripsina) humano, era capaz de inhibir todas las subunidades en el parásito, mientras que el específico por la $\beta 1$ (actividad caspasa) humana no inhibía ninguna de las subunidades en *P. falciparum* (Figura I.24). Dichas diferencias en la subunidad $\beta 1$ podrían ser debidas a la ausencia de plegamiento en la posición S3 de la subunidad $\beta 1$ de *P. falciparum*, lo que podría impedir que algunos inhibidores pudieran acceder a su centro activo (Li et al., 2014).

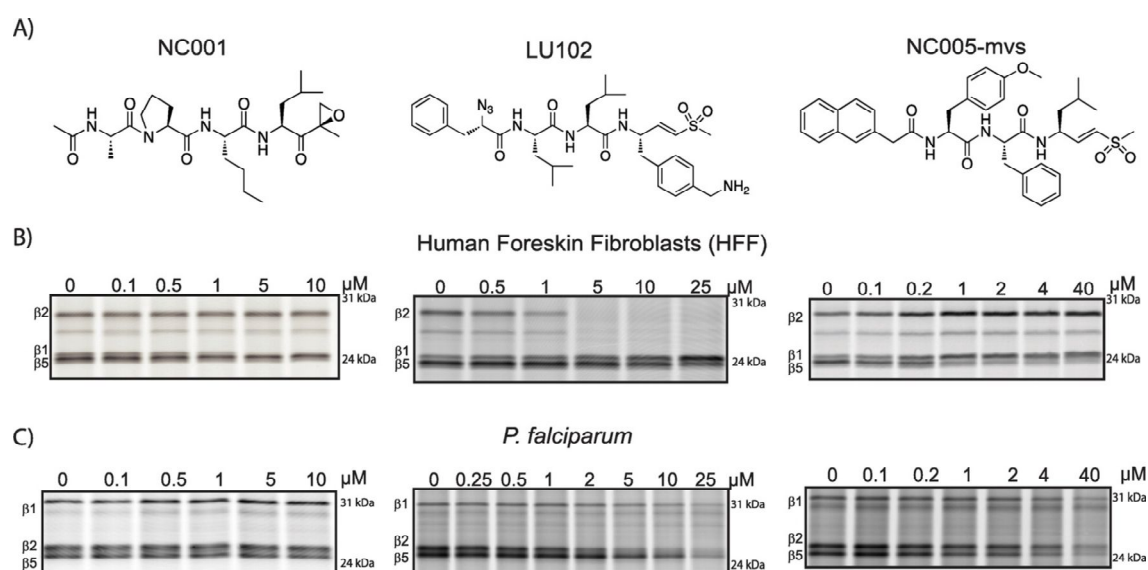


Figura I. 24. Inhibidores selectivos de subunidad en humano con distinta selectividad en *P. falciparum*. **A.** Nombre y estructuras de los inhibidores selectivos de subunidad en humano. **B.** SDS-PAGE de las subunidades de proteasoma de células humanas HFF (human foreskin fibroblasts), marcadas con la sonda fluorescente MV151 a 2 μ M, tras el tratamiento con los inhibidores (1h) a diferentes concentraciones. **C.** SDS-PAGE de las subunidades de proteasoma de *P. falciparum*, marcadas con la sonda fluorescente BMV037 a 10 μ M, tras el tratamiento con los inhibidores (1h) a diferentes concentraciones. Fuente: Li et al., 2014

Utilizando esta aproximación junto con un inhibidor vinyl sulfona (PR709A) específico de la $\beta 5$ en *P. falciparum*, se observó que los parásitos son especialmente sensibles a la inhibición selectiva de dicha actividad de su proteasoma durante la esquizogonia (Li et al., 2014). La correlación entre la inhibición durante un corto periodo de tiempo de la actividad $\beta 5$ y la disminución del crecimiento del parásito sugiere que dicha subunidad podría ser esencial para la reducción de la replicación del esquizonte, ya que posiblemente diferentes proteínas de su ciclo celular estén reguladas a través del proteasoma. Este compuesto además, no inhibió ninguna subunidad del proteasoma humano en las células HFF.

Por otro lado, también se observó que la inhibición específica de la subunidad $\beta 2$ durante un corto periodo de tiempo con el inhibidor no afectaba al crecimiento del parásito, mientras que cuando se inhibían todas las subunidades (tiempo corto y tratamiento no continuo), el crecimiento del parásito se veía afectado en todas las etapas intraeritrocíticas, obteniéndose la mayor reducción del crecimiento del parásito (Li et al., 2014). Por tanto, aunque la etapa de esquizonte del parásito puede verse afectada con tan solo la inhibición de la subunidad $\beta 5$, la inhibición de la subunidad $\beta 5$ con $\beta 2$ y/o $\beta 1$ es necesaria para inhibir el crecimiento en todas las etapas y conseguir la muerte del parásito.

Los resultados observados en *P. falciparum* fueron confirmados *in vivo* en el ratón con *P. chabaudi*. La inhibición de la subunidad $\beta 5$ por el inhibidor PR709A cuando se encontraban en el estadio de esquizontes, o la inhibición de todas las subunidades β por LU102 ($\beta 2$ selectivo en mamífero), no parecían producir toxicidad para el hospedador. Además, ambos inhibidores fueron sinérgicos produciéndose una gran disminución de la replicación del parásito en combinación, con una baja toxicidad para el ratón (Li et al., 2014).

Recientemente, la estructura del proteasoma de *P. falciparum* ha sido elucidada mediante cryo-EM (Li et al., 2016b; Li et al., 2016a). La cristalografía por rayos X del proteasoma de *P. falciparum* no ha sido posible debido al bajo rendimiento en la purificación del proteasoma proveniente de los cultivos del parásito. A pesar de ello, la estructura obtenida por cryo-EM ha permitido estudiar en mayor profundidad las diferencias existentes entre las subunidades catalíticas del parásito y las subunidades humanas, y a determinar las preferencias de unión

al sustrato que posee el proteasoma de *P. falciparum*, lo que puede ser de gran ayuda para guiar la síntesis química, y mejorar las propiedades de las moléculas para el desarrollo de nuevos antimaláricos.

Con el fin de estudiar la especificidad por sustrato del proteasoma de *P. falciparum* con respecto al humano, se realizaron estudios de degradación de numerosos péptidos sintéticos, siendo analizados por cromatografía líquida y MS. Esto permitió determinar aquellos péptidos que eran cortados de manera específica por el proteasoma del parásito con respecto al humano, lo que ha sido la base para el diseño de nuevos inhibidores específicos frente a *P. falciparum*, con baja toxicidad para el hospedador.

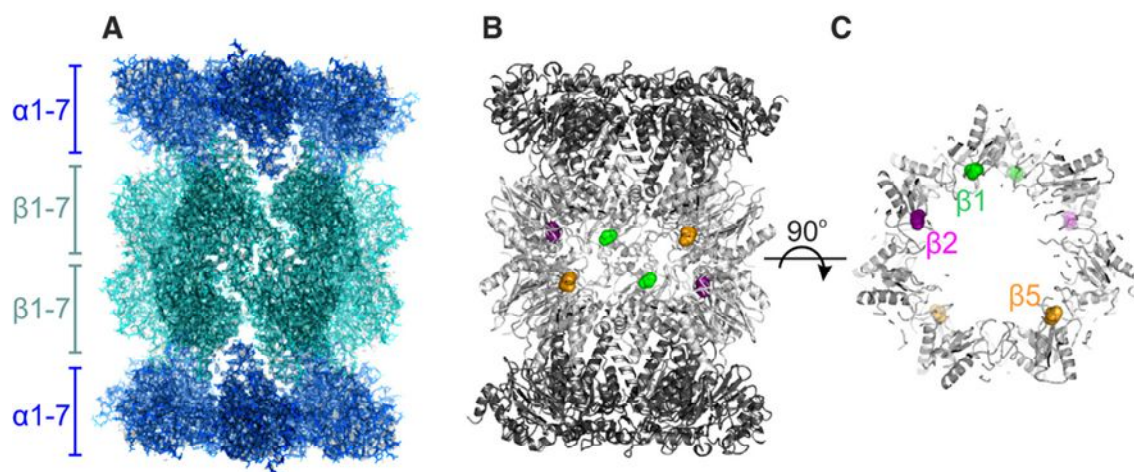


Figura I. 25. Estructura del proteasoma 20S de *P. falciparum* por cryo-EM. Resolución de 3.6 Å. **A.** Vista general del proteasoma 20S con las subunidades α y β indicadas. La superficie de atrás del barril fue eliminada para una mejor visualización. **B.** Localización de los sitios proteolíticos dentro de la cámara del proteasoma. Las proteínas están representadas como cintas, mientras que los sitios catalíticos están representados como esferas. $\beta 1$ verde, $\beta 2$ morado y $\beta 5$ naranja. **C.** La misma representación que en C pero vista desde arriba. Tan solo han sido representadas las subunidades β más cercanas. Fuente: Li *et al.*, 2016a. (EMDB-3231, PDB 5FMG).

Se ha visto que *P. falciparum* parece tener preferencia por residuos aromáticos en posiciones P1 y P3. Teniendo en cuenta esto, se han sintetizado nuevas moléculas péptido vinil sulfonas (WLL-vs, WLW-vs and LLW-vs) a partir de inhibidores conocidos, cuyas leucinas en las posiciones P1 y P3 fueron reemplazadas por residuos de triptófano (Figura I.26A). Estos péptidos actuaban uniéndose covalentemente al residuo treonina de las subunidades catalíticas. El

cambio en la posición P1 disminuyó la inhibición de la subunidad $\beta 5$ (LLW-vs), la variación en la P3 llevó a una potente inhibición de las actividades $\beta 5$ y $\beta 2$ (WLL-vs), y el cambio en ambas posiciones (WLW-vs) produjo además de una potente inhibición, la selectividad por la subunidad $\beta 2$ del parásito (Figura I.26B).

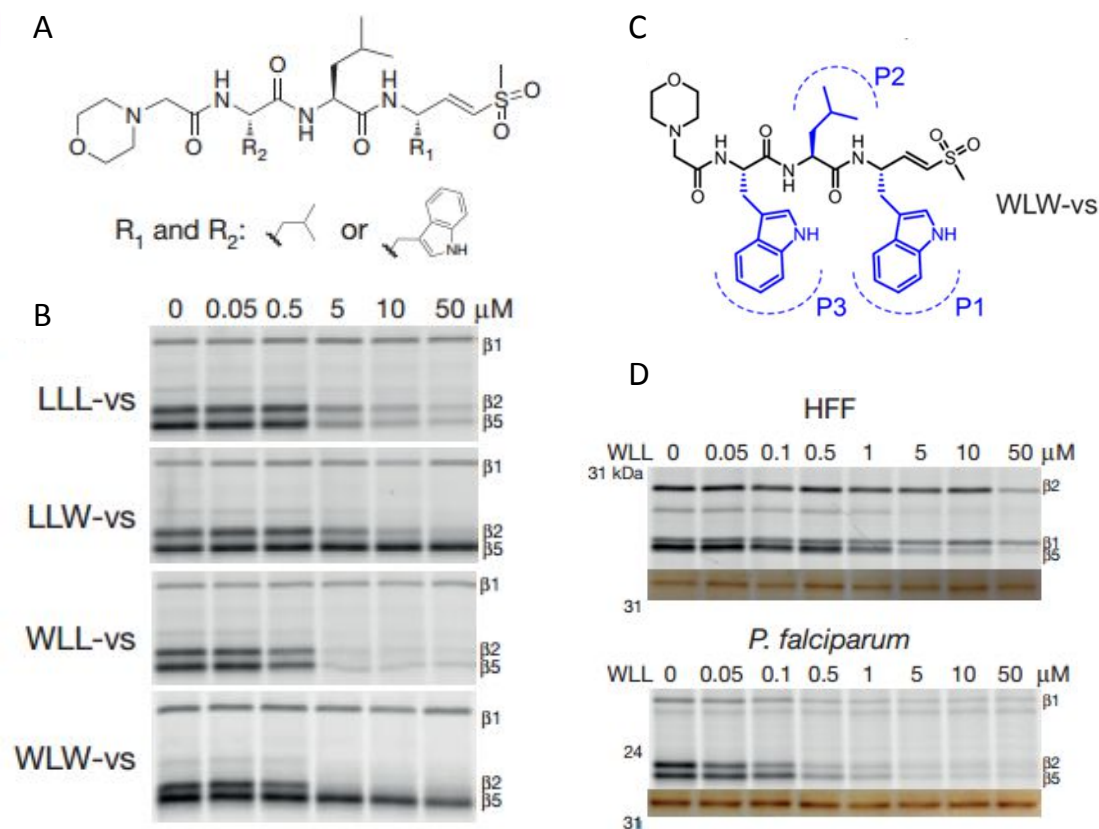


Figura I. 26. Estudio de especificidad de los nuevos inhibidores de proteasoma péptido vinil sulfonas. **A.** Inhibidores diseñados teniendo en cuenta la preferencia por sustrato del proteasoma de *P. falciparum* en posiciones P1 y P3. Dichas posiciones son substituidas por leucina (L) o triptófano (W). **B.** Inhibición selectiva de las subunidades del proteasoma de *P. falciparum* por los inhibidores diseñados, utilizando la sonda química BMV037 a 10 μ M (Figura I.25). **C.** Inhibidor de proteasoma específico de las subunidad $\beta 2$ de *P. falciparum*. Posiciones P1 y P3 substituidas por triptófano. **D.** HFFs o esquizontes de *P. falciparum*, fueron tratados con el inhibidor WLL-vs durante 1h. Los marcajes con las sondas químicas fluorescentes (10 μ M BMV037 para *P. falciparum* y 2 μ M MV151 para HFFs) fueron realizados tras la lisis. El panel inferior corresponde a una tinción en plata. A, B y D de la fuente: Li et al., 2016b. C obtenido de la fuente: Li et al., 2016a.

En la unión del compuesto WLW-vs (Figura I.27C) a la subunidad $\beta 2$, el anillo morfolino, la cadena de leucina y el grupo vinil sulfona, estaban orientados hacia el interior de la cavidad del complejo, mientras que las cadenas de triptófano en posición P1 y P3 se orientaron hacia la superficie de la proteína. De acuerdo a la

estructura cryo-EM, la selectividad de unión radica en una apertura inusual del sitio activo $\beta 2$, el cual permite acomodar las cadenas de triptófano P1 y P3 en *P. falciparum* (Figura I.28). Esta es la única subunidad, tanto en *P. falciparum* como en el humano, compatible con el volumen de la posición P1, de ahí la especificidad.

La inhibición exclusiva de la subunidad $\beta 2$ de *P. falciparum*, no es suficiente para llevar a la muerte del parásito (Li et al., 2014). Sin embargo, *in vivo* se ha visto que el compuesto sinergiza con la DHA, produciendo la muerte de los parásitos resistentes a la Artemisinina. Esto sugiere que un inhibidor específico de $\beta 2$, podría ser usado en la clínica en combinación (Li et al., 2016b), en aquellos lugares donde la resistencia a Artemisinina sea un problema.

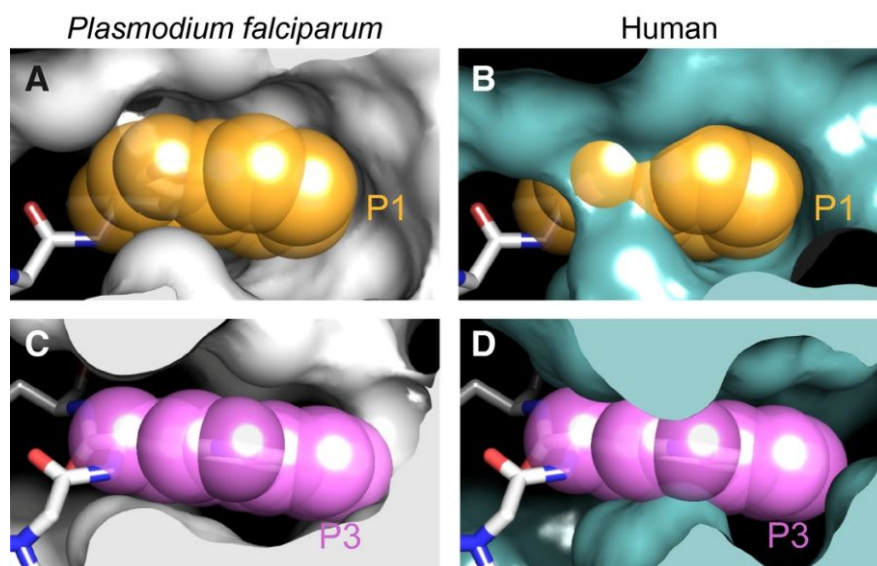


Figura I. 27. Comparación de la accesibilidad del compuesto WLW-vs a los sitios activos $\beta 2$ de humano y *P. falciparum*. A. El triptófano en la posición P1 del compuesto WLW-vs se une al sitio activo $\beta 2$ de *P. falciparum* en la estructura cryo-EM de *P. falciparum*. B. La posición P1 del compuesto WLW-vs superpuesto en el sitio activo $\beta 2$ de la estructura cryo-EM del proteasoma humano (PDB 5A0Q). C y D. Como A y B, pero se muestra la posición P3 del compuesto WLW-vs en el sitio activo $\beta 2$ de *P. falciparum* y humano respectivamente. Mientras que las cadenas P1 y P3 están bien acomodadas en el sitio activo $\beta 2$ del parásito, restricciones estéricas limitan su accesibilidad al sitio activo $\beta 2$ humano, el cual es ocupado tan solo a altas concentraciones de ligando, donde se pierde la especificidad. Fuente: Li et al., 2016a

Por otro lado, como ya se ha comentado, los cambios en la posición P3 del compuesto WLL-vs, permite que el compuesto se acomode en las subunidades

catalíticas $\beta 2$ y $\beta 5$ del parásito, siendo solo efectivo frente a la $\beta 5$ humana (Figura I.27D). La inhibición simultánea de ambas subunidades aumenta la toxicidad para el parásito, tanto *in vitro* como *in vivo* (Li et al., 2014). El tratamiento con el compuesto WLL-vs fue suficiente para reducir la parasitemia a unos niveles indetectables, sin tener una toxicidad aparente para el hospedador (Li et al., 2016b).

Todas estas diferencias entre el humano y *P. falciparum*, junto con la baja replicación de las células de mamífero, han llevado a validar el proteasoma como una buena diana terapéutica, ya que no solo es esencial, sino que es posible identificar inhibidores específicos con baja toxicidad para el hospedador, y que además pueden ser activos en diferentes puntos del ciclo de vida del parásito.

b) Inhibidores de otros componentes del UPS

Dentro del UPS existen otras posibles dianas terapéuticas con una menor similitud a su ortólogo humano que el proteasoma, como lo son las enzimas conjugadoras E2, las E3 ligasas y las DUBs. La falta de conocimiento del UPS de *P. falciparum* ha dificultado identificar dichas dianas terapéuticas, y por tanto la búsqueda de nuevos inhibidores que podrían ser más selectivos. Dado el impacto que podría tener en el campo de la malaria, en estos últimos años se han publicado algunas campañas de HTS para identificar inhibidores de algunas de las pocas proteínas del sistema conocidas en el parásito.

PfUCHL3 ha sido identificada como una DUB esencial para el parásito y con baja similitud con su ortólogo humano. Esto, junto con el hecho de que ya existen en el mercado inhibidores frente a DUBs similares, la han convertido en una diana terapéutica prometedora (Artavanis-Tsakonas et al., 2010). La resolución de su estructura cristalina y de la estructura de su homólogo humano, ha permitido identificar *in silico* posibles inhibidores selectivos de la enzima del parásito (Franco et al., 2013). Dos de los compuestos identificados demostraron además tener actividad en célula entera, inhibiendo el crecimiento del parásito.

ATG8 es una proteína de la familia de la ubiquitina implicada en autofagia en eucariotas. En *P. falciparum* se ha visto que es esencial (Duszenko et al., 2011) y que se encuentra parcialmente conjugada a la membrana del apicoplasto, relocalizándose en vesículas acídicas cercanas a la vacuola digestiva ante la falta de nutrientes (Tomlins et al., 2013). La activación de ATG8 se produce a través de la enzima activadora E1 ATG7, la cual la transfiere a la enzima conjugadora E2 ATG3. En *P. falciparum* la deficiencia en ATG7 lleva a un drástico defecto en el crecimiento del parásito (Walker et al., 2013). Todo ello ha llevado a que ATG8 se haya considerado una buena diana, y por tanto a la búsqueda de inhibidores de su interacción con su enzima conjugadora E2, mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) (Hain et al., 2014).

Otros inhibidores de DUBs humanas como el b-AP15 también han sido testados en *P. falciparum*. Dicho inhibidor inhibe tanto la UPS14 humana como la del parásito, produciendo una acumulación de proteínas ubiquitinadas K48, y llevando finalmente a una inhibición del crecimiento del parásito en su etapa intraeritrocítica. La actividad enzimática de la enzima fue determinada midiendo la hidrólisis de ub-AMC (Wang et al., 2015).

3. Objetivos

3. OBJETIVOS

La aparición de resistencias frente a los antimaláricos conocidos, hacen imprescindible el desarrollo de nuevos antimaláricos con estructuras y mecanismos de acción novedosos. El primer paso para ello, es la identificación de nuevas dianas terapéuticas a través del estudio de la biología del parásito y sus mecanismos de infección. Esto requiere además de la disponibilidad de una serie de herramientas que permitan el trabajo *in vitro* e *in vivo* con el parásito. Sin embargo, aún existen dificultades para obtener cierto tipo de cultivos, o incluso para realizar algunos estudios de biología molecular, donde las herramientas clásicas utilizadas en otros organismos eucariotas fallan. Quizá por ello actualmente tan solo existe un pequeño número de dianas terapéuticas validadas, entre ellas el UPS, que es capaz de ser inhibido por pequeñas moléculas, siendo esencial para la supervivencia del parásito.

El proteasoma del parásito podría ser una de las dianas terapéuticas más inmediatas, por ser el componente del UPS más estudiado hasta el momento. El resto de componentes podrían ser incluso más interesantes, debido a su baja homología con el hospedador. Sin embargo, el conocimiento del UPS del parásito es aún muy limitado, entre otras cosas debido a los obstáculos técnicos ya comentados. Paralelamente al desarrollo de este trabajo dos grupos de investigación llevaron a cabo la purificación de proteínas ubiquitinadas de *P. falciparum* en su etapa intraeritrocítica, tras aislarlo previamente del eritrocito. La identificación de proteínas ubiquitinadas del parásito sin un aislamiento previo del hospedador, así como el uso de nuevas herramientas que permitan la purificación en condiciones más fisiológicas, podrían incrementar el número de proteínas ubiquitinadas y elucidar la implicación del proteasoma en otros procesos esenciales, como en la interconexión con el hospedador y su remodelación.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente comentado, los objetivos fundamentales de este trabajo fueron los siguientes:

- 1) Establecer un método para obtener de una forma rápida y sencilla cultivos sincrónicos con parasitemias altas. Es un requisito esencial para poder ver por MS las diferencias en las proteínas provenientes de eritrocitos sin infectar e

infectados, y en diferentes etapas intraeritrocíticas del parásito. Las condiciones de cultivo *in vitro* estándar no permiten tener parasitemias mayores al 15%, debido a los sistemas de regulación de la población que posee el parásito. CAPÍTULO 1.

- 2) Establecer un método de purificación, que permita de la forma más fisiológica posible, capturar proteínas ubiquitinadas y sus factores de interacción (ubiquitoma) de eritrocitos infectados con *P. falciparum*, con la mínima unión de proteínas inespecíficas y superando los problemas asociados a la presencia de hemoglobina. El método basado en las TUBEs permite incrementar el número de proteínas identificadas por MS al proteger de la degradación por el proteasoma y la acción de las DUBs en el momento de la lisis. CAPÍTULO 2.
- 3) Los dos objetivos anteriores son necesarios para conseguir el tercer objetivo: Identificar el ubiquitoma simultáneamente de *P. falciparum* y su hospedador, el eritrocito, a lo largo del ciclo intraeritrocítico del parásito. La finalidad es estudiar por primera vez los procesos regulados por el UPS, tanto en el parásito como en su hospedador, durante el proceso de infección. Para ello se debía aislar el ubiquitoma del parásito y del hospedador mediante el método establecido en el capítulo 2, en condiciones de no infección (eritrocitos no infectados), en eritrocitos infectados con anillos, con trofozoitos y con esquizontes, de muestras sincrónicas y a alta parasitemia, obtenidas mediante el método descrito en el capítulo 1. CAPÍTULO 3.
- 4) Establecer dos ensayos de alto rendimiento robustos basados en las TUBEs, que permitan cuantificar proteínas ubiquitinadas provenientes de lisados celulares de eritrocitos infectados con *P. falciparum*, así como detectar cambios en sus niveles ante la presencia de inhibidores del UPS. La medida de la acumulación de proteínas ubiquitinadas es una medida indirecta de la actividad del sistema, y permite detectar inhibidores de diferentes componentes del UPS, como el proteasoma o las DUBs. Por tanto, estos ensayos podrían utilizarse para identificar, en campañas de HTS, nuevas estructuras que actúen a través de diferentes componentes de la vía ubiquitina proteasoma. La deconvolución de los inhibidores identificados podría ayudar también a identificar nuevas dianas terapéuticas dentro del UPS del parásito. CAPÍTULO 4.

4. Trabajos experimentales publicados

CAPÍTULO 1

Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture

Lydia Mata-Cantero^{1,2}, Maria J Lafuente^{1*}, Laura Sanz¹ and
Manuel S Rodriguez^{2,3}

Author details

¹Medicines Development Campus, Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline, Severo Ochoa 2, Tres Cantos 28760, Madrid, Spain.

²Proteomics Unit, CICbioGUNE Ed. 801A Parque Tecnológico de Bizkaia, 48160 Derio, Spain.

³Ubiquitylation and Cancer Molecular Biology, Inbiomed, Mikeletegi 81, 20009 San Sebastian, Spain.

Published in *Malaria Journal*, 2014, 13:112

<http://www.malariajournal.com/content/13/1/112>

4.1. CAPÍTULO 1

Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture

ABSTRACT

Background: The establishment of methods for an *in vitro* continuous culture of *Plasmodium falciparum* is essential for gaining knowledge into its biology and for the development of new treatments. Previously, several techniques have been used to synchronize, enrich and concentrate *P. falciparum*, although obtaining cultures with high parasitaemia continues being a challenging process. Current methods produce high parasitaemia levels of synchronized *P. falciparum* cultures by frequent changes of culture medium or reducing the haematocrit. However, these methods are time consuming and sometimes lead to the loss of synchrony.

Methods: A procedure that combines percoll and sorbitol treatments, the use of magnetic columns, and the optimization of the *in vitro* culture conditions to reach high parasitaemia levels for synchronized *Plasmodium falciparum* cultures is described.

Results: A new procedure has been established using *P. falciparum* 3D7, combining previous reported methodologies to achieve *in vitro* parasite cultures that reach parasitaemia up to 40% at any intraerythrocytic stage. High parasitaemia levels are obtained only one day after magnetic column purification without compromising the parasite viability and synchrony.

Conclusions: The described procedure allows obtaining a large scale synchronized parasite culture at a high parasitaemia with less manipulation than other methods previously described.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, High parasitaemia, Synchronous cultures, Magnetic columns

1. INTRODUCTION

Malaria is one of the deadliest infectious diseases in the world. It is responsible for more than 300 million clinical cases and over two million deaths annually [1]. The most severe form is caused by the protozoan parasite *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). *Plasmodium* has a complex multistage life cycle, with sexual reproduction in the *Anopheles* mosquito and asexual phase within the human host, where it develops in liver and erythrocytic cells. The establishment of an *in vitro* continuous culture of *P. falciparum* is essential for gaining insight into parasitic immunology, biology and pathogenesis as well as for the development of new drugs and vaccines [2, 3, 4, 5]. The intraerythrocytic stage of the malaria parasite is the primary target for anti-malarial drug development as it is associated with pathogenesis. Therefore, main efforts have been focused on the development of intraerythrocytic parasite cultures [3]. Although some culture conditions have been improved, the technique is essentially the same as described by Trager and Jensen [4], and difficulties to obtain cultures with a parasitaemia higher than 10% still remain. Theoretically the parasitaemia of an *in vitro* *P. falciparum* culture could increase up to 16-fold per life cycle, however only an increase of three- to eight-fold is observed in 48 hours [6, 7]. The inhibition of malaria parasite development has been associated with medium acidification due to the secretion of lactic acid [8, 9]. Other mechanisms have also been proposed to explain the regulation of parasite density including increased parasite apoptosis [10] through a quorum sensing mechanism [11]. This process is based on the production of low molecular mass-signalling molecules called auto-inducers, which serve as a protective mechanism by restricting parasite propagation [10, 11].

Proteomic studies [12] can contribute to understanding the biology of this complex parasite and also to identifying potential drug and vaccine targets. However, uninfected red blood cells (uRBCs) can interfere in functional proteome analysis of the malaria intraerythrocytic cycle. In this regard, there is a real need for the achievement of a synchronized *P. falciparum* parasite culture with high parasitaemia. Synchronization of *P. falciparum* facilitates the identification of

stage-specific proteins while high parasitaemia levels are critical to enrich *P. falciparum* and infected red blood cells (iRBCs) protein content.

Plasmodium falciparum tends to grow in synchrony within the human host. This parasite coordination has been linked to change in temperature and circadian rhythms of the human body [13, 14], but the factors which produce synchrony in humans are not present *in vitro*. Although several techniques are frequently used to enrich specific asexual stages, the sorbitol method described by Lambros and Vanderberg [15] is the most widely used because it is versatile and easy to perform. This method is based on the differential sugar and anion permeability of infected cells during intraerythrocytic development. This selective permeability leads to a hypotonic lysis of erythrocytes infected with larger stage parasites, enriching the *P. falciparum* culture with a ring-stage population and uRBCs. percoll [16] and percoll-sorbitol gradients [17] in different proportions are other alternatives used to increase synchrony. Ring-stage iRBCs and uRBCs are separated from mature iRBCs after a high-speed centrifugation because mature parasitized iRBCs have lower density. These methods are also widely used to enrich *P. falciparum* cultures with mature iRBCs and to perform invasion assays [18, 19].

Another described method to separate and concentrate mature forms from ring-stage iRBCs with a greater efficacy makes use of magnetic columns [20]. This method takes advantage of the presence of haemozoin which is produced by the breakdown of Fe (II)-containing haemoglobin in mature parasitized erythrocytes as it is a significant source of nutrients for the parasite [21, 22, 23]. Further studies have improved the methodology using a high magnetic field gradient [23], allowing to synchronize and concentrate mature parasitized iRBCs with a purity higher than 90%, even for those *P. falciparum* strains that do not exhibit Knobs [24, 25, 26, 27]. This method is particularly suitable for molecular and biochemical analysis of the biology of the parasites, as the viability and morphology of the parasites and RBCs are not affected [28, 29, 30]. Moreover, parasites isolated using magnetic columns are able to invade new RBCs in a more reproducible manner than observed for parasites purified with percoll-sorbitol treatments [29, 30].

Current methods to obtain *P. falciparum* cultures with high parasitaemia are based on the daily replacement of culture medium or on culture dilution to low haematocrits [31, 32, 33] to preserve parasite viability. This is because the high metabolism rate of the parasite leads to the accumulation of large amount of metabolic products. Continuous flow methods are used to achieve *P. falciparum* cultures at high parasitaemia, but they are expensive and it is not always possible to work with synchronous cultures [5]. Radfar *et al.* established a protocol to produce 50% parasitaemia *P. falciparum* cultures in low haematocrit conditions [33]. This protocol, combined with alternation of sorbitol and 70% percoll treatments, results in a highly synchronized *P. falciparum* culture. The authors provide an equation to calculate the volume of culture medium required at a given developmental stage of the parasite for a desired parasitaemia in a specified concentration of RBCs [33]. The main disadvantage of the previously described methods is the labour-intensive culturing, as culture medium changes are required at any time for at least two weeks. In addition, it is difficult to avoid parasite stress and to maintain culture synchrony for such a long period.

The protocol proposed here makes use of percoll-sorbitol treatments together with magnetic column purification to get highly synchronized cultures. This is combined with a reduction in the haematocrit to increase invasion rates, which allows the achievement of high parasitaemia levels of synchronous cultures. Haematocrit and parasitaemia conditions have been established using the *P. falciparum* 3D7 strain. Parasitaemia levels up to 40% are obtained once the iRBCs, isolated by magnetic column purification, invade fresh uRBCs. Furthermore, this method provides a faster, more reproducible and less laborious methodology than previously reported methods to achieve high parasitaemia levels of synchronized parasite in *in vitro* cultures.

2. METHODS

2.1. *Plasmodium falciparum* culture

The *P. falciparum* strain 3D7A used in this study was obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource [34]. RBCs were obtained from

the Spanish Red Cross Blood Bank. *Plasmodium falciparum* strain 3D7 was grown according to the method previously described by Trager and Jensen [4]. *Plasmodium falciparum* cultures were maintained at 37°C in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 5% AlbuMAX II (Invitrogen), and 150 µM hypoxanthine (Sigma-Aldrich) (complete medium) in a 5% CO₂, 90% N₂ and 5% O₂ atmosphere using fresh uRBCs at 1% haematocrit. The parasites were cultured under these conditions in 150 sq cm culture flasks with a maximal culture media volume per flask of 150 ml. Parasitaemia levels were monitored by Giemsa-stained smears of the cultures.

2.2. Synchronization protocol

Plasmodium falciparum cultures maintained at 1% haematocrit and at least 2% parasitaemia were centrifuged at 600 g and supernatant was discarded. Twenty volumes (1 V = RBCs pellet volume) of a 5% wt/v sorbitol (sigma) solution were added to the culture pellet and cellular suspensions were incubated with gentle shaking for 10 min at 37°C. After this incubation a new centrifugation step was performed and cellular pellets were washed three times with complete medium. Finally, parasites were resuspended in 100 ml of complete medium at 0.8% haematocrit and 2% parasitaemia and grown for three days. Then, a new cycle of synchronization was performed by percoll (sigma) treatment according to the protocol described by Radfar *et al.* [33]. In order to obtain a tightly synchronized *P. falciparum* culture, synchronization was carried out when new merozoites were invading new RBCs [33], before all the schizonts had disappeared and young rings were visible. *Plasmodium falciparum* cultures were centrifuged and each 1 ml iRBC pellet was carefully placed on top of 3 ml of 70% percoll gradient (v/v) (see [33] for preparation). Each tube was centrifuged at 800 g for 10 min and it was stopped with deceleration 0. The top layer containing the schizonts was recovered and washed two times with complete media. Approximately 50 µl of schizonts iRBCs were obtained for each 100 ml of 1% haematocrit *P. falciparum* cultures (around 90% parasitaemia). Each aliquot of purified parasites were maintained in culture for 48 hours using 1 ml of fresh uRBCs in 150 sq cm culture flasks with 100 ml of complete medium (parasitaemia around 5%).

2.3. Magnetic column separation and invasion assays

The most commonly used magnetic cell fractionation system is the commercially available MACS system (Miltenyi Biotec). MACS separation columns "CS" were placed into the vario MACS® magnetic support and equilibrated by adding 60 ml of pre-warmed (37°C) RPMI medium without supplementation (incomplete medium). Magnetic separation of mature parasite forms from iRBCs was conducted 48 hours after percoll treatment. Parasite cultures from each 150 sq cm culture flask (100 ml at 1% haematocrit) were centrifuged at 600 *g* for 5 min and then resuspended with 10 ml of incomplete medium. Ten ml of *P. falciparum* culture at 10% haematocrit were loaded on the top of the column. A low flow rate was used to pass the culture through the column. The effluent containing the uRBCs, ring and young trophozoites iRBCs was discarded. Columns were washed using 30 ml of pre-warmed incomplete medium at medium flow. Column was removed from the magnetic field and 30 ml of pre-warmed (37°C) complete medium was added to elute the mature forms. Purified iRBCs recovered from column eluent were counted using a Neubauer chamber and haematocrit and parasitaemia were adjusted with fresh uRBC and complete medium according to the experiment. Before harvesting, *P. falciparum* cultures were washed twice with cold PBS. The number of RBCs was determined by counting with the Neubauer chamber and parasitaemia was estimated by microscopic examination of Giemsa-stained smears.

2.4. *Plasmodium falciparum* growth inhibition assay

The sensitivity of *P. falciparum*-infected erythrocytes to various drugs was determined using the previously described method based on ³H-hypoxanthine incorporation assay [35]. Inoculums of 0.5% parasitaemia (ring stage) and 2% haematocrit were prepared from two different *P. falciparum* cultures, both were treated with percoll and sorbitol, but one of them was subjected to an additional purification step by magnetic columns. The parasites were grown in RPMI 1640, 25 mM HEPES and supplemented with 5% Albumax. Plates were incubated at 37°C, 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂. After 24 hours of incubation, [³H] hypoxanthine was added and plates (Costar #3894) were incubated for another 24 hours. After

that period, plates were frozen and then harvested on a glass-fibre filter using a TOMTEC Cell harvester 96. Filters were dried and melted on scintillator sheets and the bound radioactivity was quantified by use of a Wallac Microbeta Trilux (Model 1450 LS- Perkin Elmer). IC50s were determined using GraFit 5 (Erithacus Software, Horley, Surrey, UK).

3. RESULTS

3.1. Synchronization and purification of *Plasmodium falciparum* 3D7 cultures

The 3D7 *P. falciparum* strain, commonly utilized for *in vitro* anti-malarial studies, was used for the development of the methodology. *P. falciparum* cultures were maintained at low haematocrit conditions (0.8-1%) to scale up the culture fastly as it has been previously reported that haematocrit has an influence on the parasite invasion rate. Parasite cultures easily reached 5-15% of parasitaemia with a media change of three times per week and the addition of new uRBC when parasites were in mature stages to facilitate the invasion. A synchronization process by sorbitol treatment was carried out to enrich ring-stage parasites. *Plasmodium falciparum* culture was maintained at 0.8% haematocrit and 2% parasitaemia.

After 72 hours a new synchronization was done with 70% percoll to enrich mature-stage population. Both synchronization treatments were alternated to avoid toxicity and to obtain a good synchrony window before performing the magnetic column purification. Results were optimal if the synchronization treatments were carried out when the schizonts were invading new RBCs and early rings were present in culture.

Forty-eight hours after percoll treatment, cultures in schizont stage and a parasitaemia around 10% were subjected to magnetic column purification. Only mature parasitized RBCs were retained by the magnetic field and a highly pure parasite population of iRBCs at 98% parasitaemia was eluted from the column, once magnetic field was removed (Figure 1.1). Table 1.1 summarizes the total number of iRBCs purified with magnetic columns, starting with a synchronized

culture of 100 ml at 1% haematocrit and around 10% parasitaemia. This protocol was very reproducible and approximately 1×10^8 iRBCs were obtained by purification. If a higher amount of iRBCs is required, scale up is possible.

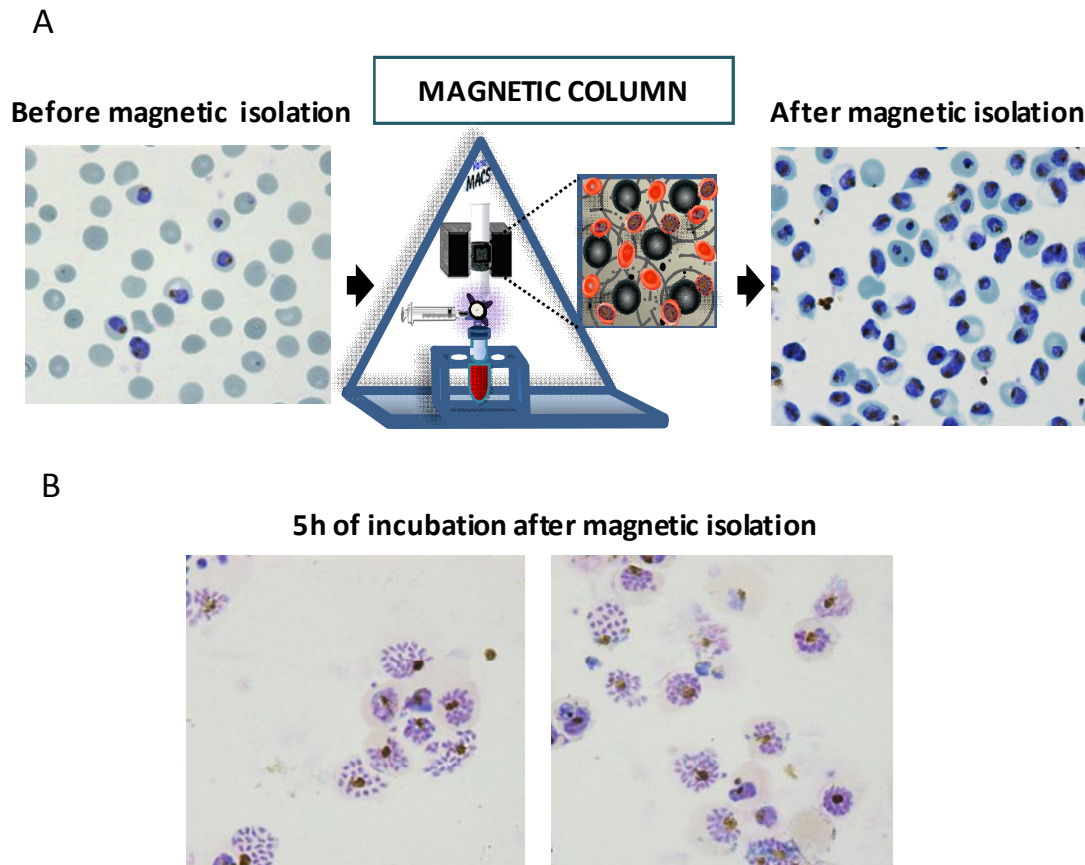


Figure 1. 1. Isolation of schizonts enriched *Plasmodium falciparum* infected red blood cells with vario mac magnetic columns. **A.** Culture of mature forms of *P. falciparum* iRBC previously synchronized with sorbitol and percoll at haematocrit 1 and P = 10% (blood smear left panel). iRBCs were passed through the magnetic column. Giemsa blood smear of the right panel shows the iRBCs obtained after the purification. **B.** Blood smears of iRBCs purified with the magnetic column after five hours of incubation. Merozoites and schizonts releasing merozoites can be observed.

To verify the ability of iRBC purified by magnetic columns to progress along the life cycle, *P. falciparum* cultures were examined by microscopy using Giemsa stained smears five hours after purification (Figure 1.1B). Figure 1.1B shows that the number of merozoites and schizonts releasing new merozoites was significantly higher than 60% in all the cases. These merozoites can be purified through a 1.2 μ m Acrodisc 32-mm syringe filter (Pall) and be used for invasion

studies [36]. This achievement is relevant as production of merozoites is critical for a better understanding of the parasite invasion process and available protocols to isolate merozoites are not very efficient. The level of synchrony of cultures is essential to achieve enriched-merozoite populations.

Table 1. 1. Number of infected red blood cells purified, starting from 100 ml of culture H = 1% and P = 10% (n = 8)

no	iRBCs after MACs purification
1	9.63×10^7
2	1.21×10^8
3	8.50×10^7
4	8.40×10^7
5	1.10×10^8
6	6.95×10^7
7	8.33×10^7
8	2.75×10^8
Average	$1.16 \times 10^8 \pm 0.667 \times 10^7$

3.2. Establishment of the conditions to obtain *Plasmodium falciparum* cultures at high parasitaemia after magnetic column purification

High parasitaemia can be achieved by decreasing the haematocrit or with frequent media replacements. In order to obtain the highest invasion rates and the maximum parasitaemia after the magnetic column purification, several studies were conducted to determine the suitable haematocrit and initial parasitaemia.

The influence of the haematocrit in the invasion capacity of parasites isolated by magnetic purification was also assessed. It is important to note that only fresh uRBCs were used in order to maximize invasion rates.

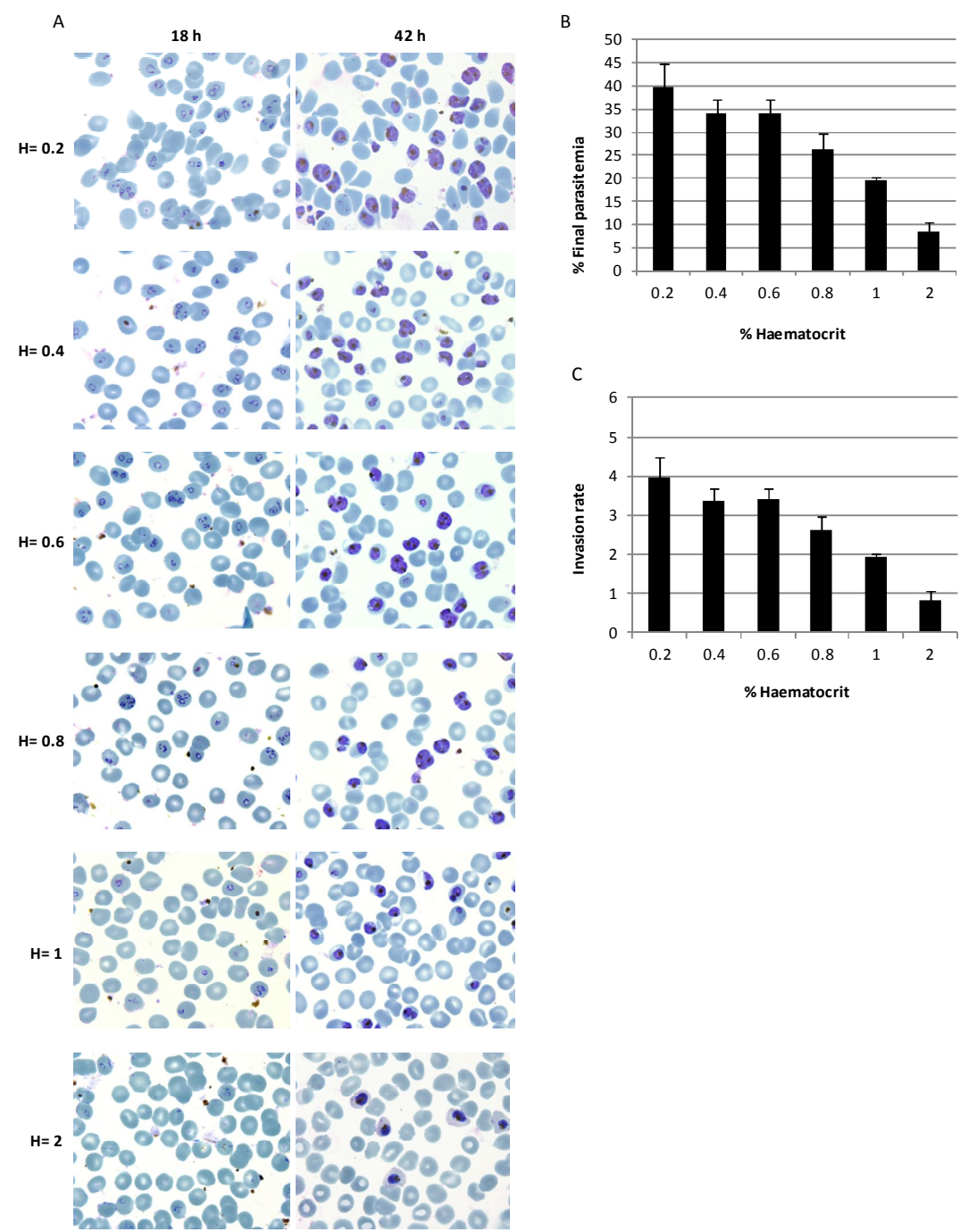


Figure 1. 2. Establishment of the haematocrit to obtain the highest invasion rate after magnetic columns purification. *Plasmodium falciparum* iRBCs isolated with magnetic column were adjusted to 10% parasitaemia at different haematocrits (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 and 2). *Plasmodium falciparum* cultures were harvested after 18 and 42 hours to determine the parasitaemia reached in each condition. **A.** Giemsa-staining smears from cultures purified by magnetic purification and allowed to reinvade new uRBCs. **B.** Parasitaemia achieved at different haematocrits tested, estimated from blood smears (n = 3). **C.** Invasion rate calculated accounting the parasitaemia obtained after 18 hours (final parasitaemia) and the initial parasitaemia of the *P. falciparum* culture (10%) (final parasitaemia/initial parasitaemia). This rate indicates the capability of the parasites to invade new RBCs.

A range of different haematocrits was tested while maintaining the parasitaemia at 10% in all the cultures. Isolated schizonts were kept in culture allowing them to invade new uRBCs under the different conditions described. Samples were collected after 18 hours in culture and parasitaemia levels were estimated by microscopy examination of Giemsa-stained smears (Figure 1.2A). Merozoites were able to infect new uRBCs, but the merozoite invasive capacity after schizont rupture was affected by the haematocrit level being lower at higher haematocrits (Figure 1.2A and B). The maximum invasion rate was $3.97 (\pm 0.50)$ and it was achieved when the haematocrit was fixed at 0.2% (Figure 1.2C). *Plasmodium falciparum* parasites purified by magnetic columns cultured at 1% haematocrit were able to reach a $19.58\% (\pm 0.78\%)$ parasitaemia (Figure 1.2B), a two-fold increase compared to *P. falciparum* cultures without any purification step (Figure 1.1A). Thus, the isolation of iRBCs using magnetic columns significantly increased the invasion rates as it was reported [29, 30], a good indication of the viability of these parasites (Figure 1.2B and C). Moreover, additional sampling was made after 42 hours of incubation to verify the capability of the parasites to form healthy schizonts (Figure 1.2A).

Parasites isolated using this protocol were able to complete their entire life cycle and kept the synchrony window obtained by performing three synchronization steps. When *P. falciparum* cultures with different haematocrits were compared a small number of gametocytes (around 1%) were observed at the highest haematocrits tested, revealing a stress condition typically generated by the parasite. In order to assess the influence of the initial parasitaemia on the invasion rates and in the final parasitaemia achieved, a range of different parasitaemias were tested fixing a 0.2% haematocrit, which previously had been considered as the optimal. A maximum invasion rate of 4.74 ± 0.57 was obtained with the lowest initial parasitaemia tested (1%) (Figure 1.3C). However, with respect to the final parasitaemia reached, it was lower than that obtained with other conditions tested (Figure 1.3A, B and C). These results show that the parasite is able to invade new RBCs depending on the amount of parasites and the concentration of host cells present in the culture medium.

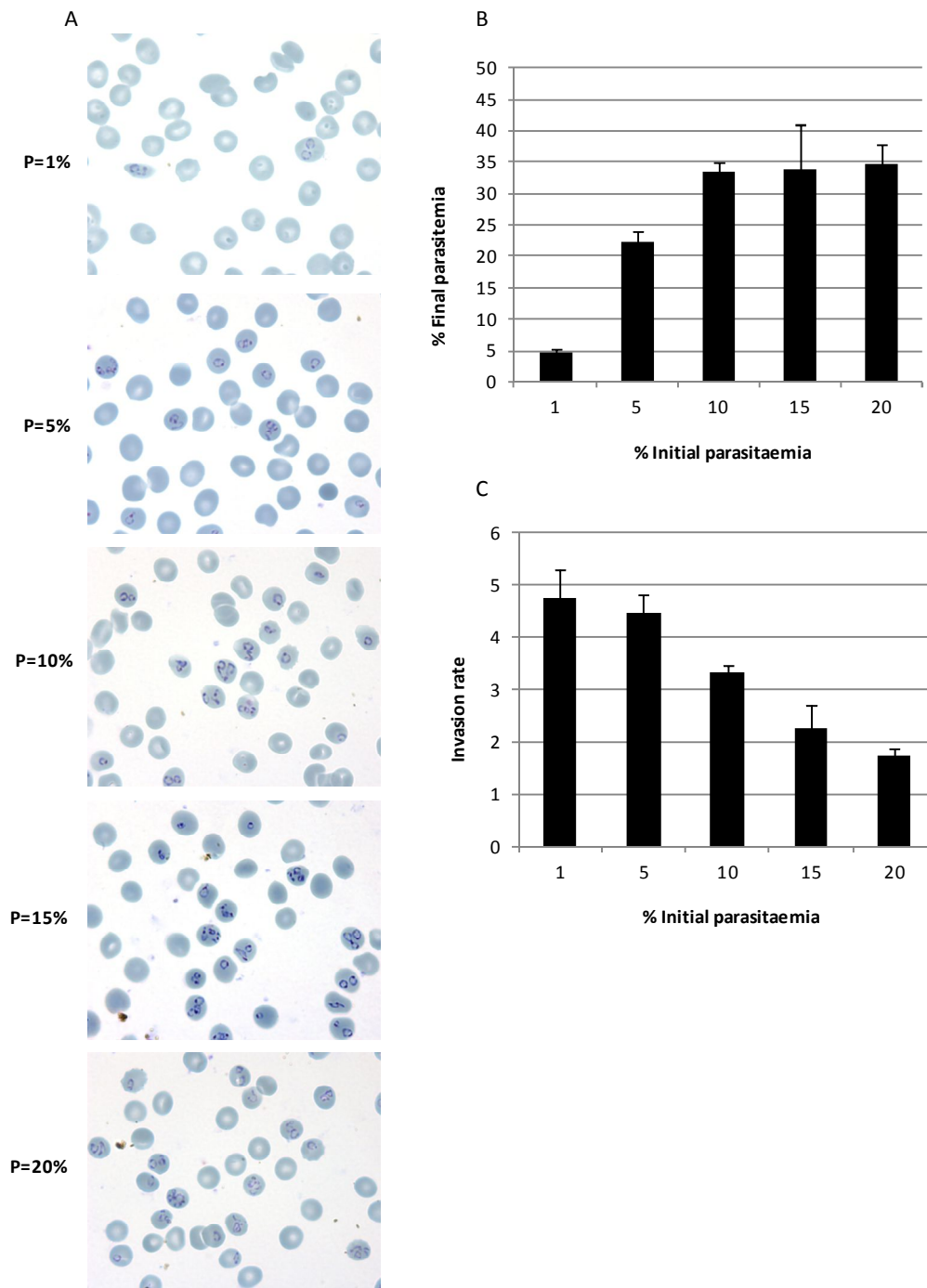


Figure 1. 3. Establishment of the initial parasitaemia after magnetic column purification. *Plasmodium falciparum* iRBCs isolated with magnetic columns were adjusted to 0.2% haematocrit and different parasitaemias (1, 5, 10, 15, and 20%). *Plasmodium falciparum* cultures were harvested after 18 hours to determine the parasitaemia levels. **A.** Giemsa-staining smears from cultures purified by magnetic purification and allowed to reinvade new uRBCs. **B.** Parasitaemia achieved at 0.2% haematocrit with the different initial parasitaemias tested was estimated from blood-smears (n = 3). **C.** Invasion rate calculated accounting for the parasitaemia obtained after 18 hours (final parasitaemia) and the initial parasitaemia of the *P. falciparum* culture (final parasitaemia/initial parasitaemia). This rate indicates the capability of the parasites to invade new RBCs.

This is consistent with previous studies in which the inhibition of the parasite development has been associated to the low pH due to the secretion of lactic acid (produced by the parasites) to the medium [8, 9] and to the presence of auto-inducers that restrict the parasite propagation [10]. The isolation of the iRBCs using magnetic columns could be contributing to remove auto-inducers present in the media. The dilution of parasite cultures might also prevent parasite mechanisms involved in the restriction of parasite invasion. Importantly, removal of old uRBCs and addition of fresh uRBCs increases the invasion rates.

In order to check the reproducibility and robustness of the method previously described, eight independent replicates were used (Table 1.2). Final conditions of 0.2% haematocrit and 10% initial parasitaemia were able to achieve the highest parasitaemia with the minimum amount of initial *P. falciparum* culture. Forty per cent of parasitaemia was obtained after 18 hours in all performed experiments, showing the robustness of the method. Harvesting of high parasitaemia culture after 24 h or 48 h from the magnetic column purification is recommended as gametocytes appeared when cultures were maintained along the time, underlining the stress produced by the high parasite population.

Further studies were conducted to assess the susceptibility of the parasites to commercially available anti-malarial drugs, which affect different pathways of the parasite physiology (Chloroquine, Artemisinin, Pyrimethamine, and Atovaquone), to check that the viability of the parasite after magnetic column purification is not compromised. Similar IC₅₀ and inhibition curve profiles for all the drugs tested were obtained for *P. falciparum* cultures isolated by the method previously described and for cultures not subjected to magnetic column purification (Table 1.3).

Table 1. 2. Reproducibility of the final protocol using haematocrit 0.2 and initial parasitaemia of 10%

No	Final number of iRBCs ¹	Final parasitaemia (%) ²
1	9.63 x 10 ⁸	46.57
2	1.21 x 10 ⁹	39.42
3	8.50 x 10 ⁸	48.67
4	8.40 x 10 ⁸	39.17
5	1.10 x 10 ⁹	30.00
6	6.95 x 10 ⁸	39.78
7	8.33 x 10 ⁸	34.00
8	2.75 x 10 ⁹	33.46
Average	1.16 x 10 ⁹	38.88

¹Number of iRBCs harvested 18h after the magnetic column purification, being initially adjusted to 0.2% haematocrit and 10% initial parasitaemia.

²Parasitaemia of the *P. falciparum* culture harvested after 18h from the magnetic column purification, being initially adjusted to 0.2% haematocrit and 10% initial parasitaemia.

Table 1. 3. Effect of drugs on *Plasmodium falciparum* growth using cultures grown at low and high parasitaemia

Drug	IC50 (nM)	
	P= 40%	P= 5%
Atovaquone	1.00 ± 0.17	0.95 ± 0.14
Chloroquine	11.33 ± 3.48	16.30 ± 2.20
Artemisinin	40.75 ± 2.35	40.29 ± 6.05
Pyrimethamine	112.00 ± 53.62	117.59 ± 89.61

An integrated view of the whole purification process is shown in Figure 1.4, where the scale up of the culture has been taken into account. If a large amount of culture is not required the procedure can be started at day 5. The applications can be numerous and the procedure can be partially or fully applied depending on the nature of the analysis required. For example, if a high synchrony is not essential, steps two and three can be omitted, or if only schizonts-enriched iRBCs are needed, the protocol could be stopped at step four after iRBCs purification, obtaining more than 98% parasitaemia.

This procedure could be applied to other *P. falciparum* strains, but the timing and the invasion conditions should be adjusted due to the different growth rates of each strain.

4. CONCLUSIONS

A new procedure based on the use of sorbitol, percoll and magnetic column purification is proposed to obtain *in vitro* *P. falciparum* cultures with a short-cycle window and with high parasitaemia levels (up to 40%) enriched at any intra-erythrocytic stage of the parasite. This method has several advantages over previously established methods: a) it is a less time-consuming protocol because it does not require continuous medium changes. Medium is only changed every two days and the same haematocrit is maintained until the magnetic column purification step, b) this method does not require long periods of *in vitro* incubation, the whole process takes two weeks if a large amount of culture is required. However, final 40% parasitaemia is achieved only one day after the last synchronization step by magnetic column purification without compromising parasite viability. This fact could overcome the disadvantage of other methods where unhealthy parasites can be produced due to the requirement of the gradual increase of the parasitaemia during several days with the subsequent loss of synchrony, c) it is highly reproducible as the same results are obtained from many different experiments, d) different *P. falciparum* stages can be harvested and

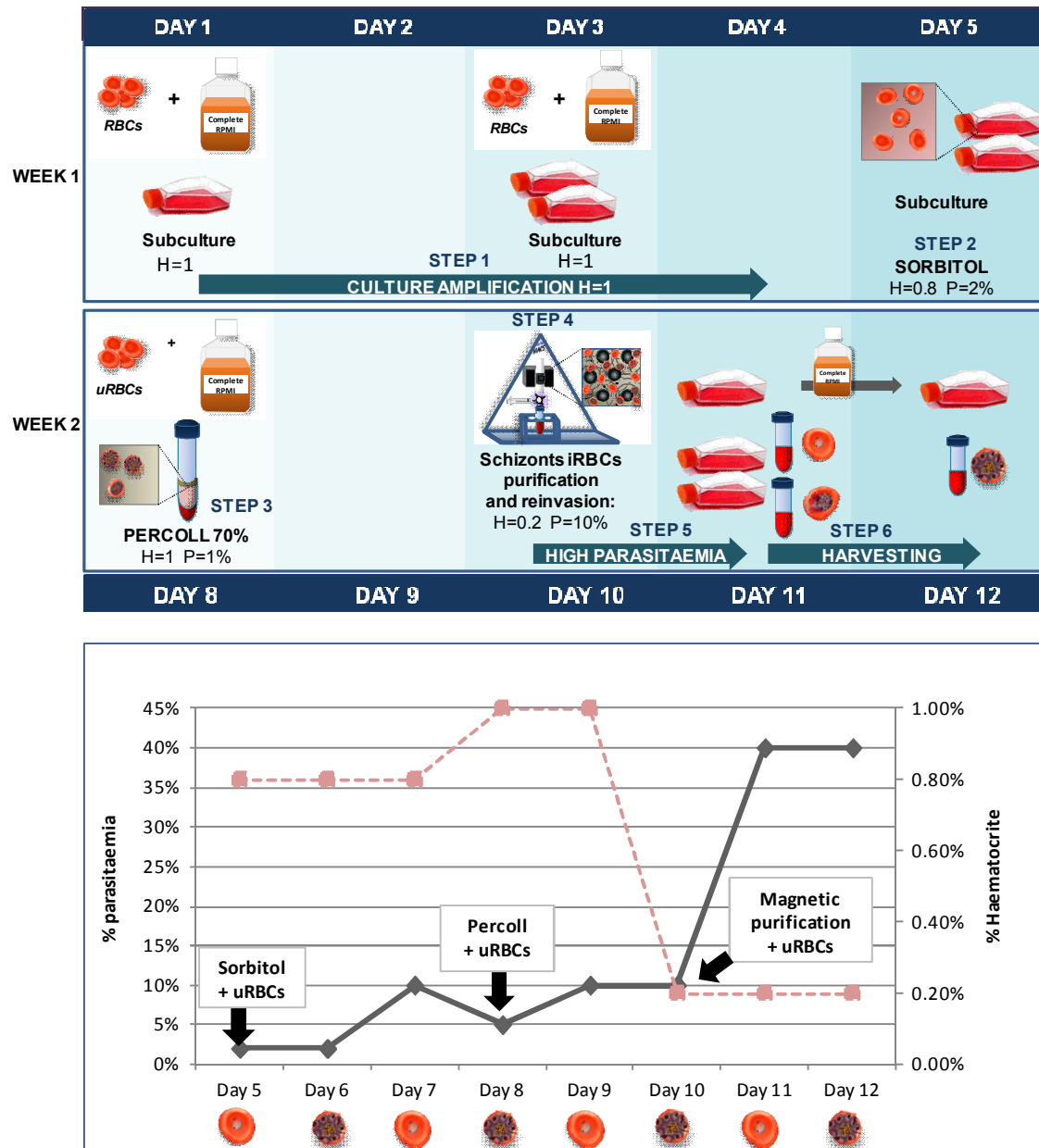


Figure 1. 4. Summary of the complete protocol. *Plasmodium falciparum* culture is maintained at 1% haematocrit during the first week to scale up the *P. falciparum* culture. *Plasmodium falciparum* culture is synchronized with 5% wt/v sorbitol and then adjusted to H = 0.8% and P = 2%. percoll is carried out after three days to purify the schizonts and *P. falciparum* culture is adjusted to H = 1% and P = 1%. Forty-eight hours later, *P. falciparum* culture enriched with mature forms is passed through the vario mac magnetic column to isolate the schizonts-enriched iRBCs. iRBCs obtained are adjusted to H = 0.2% and P = 10% and after 18 hours *P. falciparum* ring-enriched culture at approximately 40% parasitaemia is harvested. If a trophozoite or schizont-enriched population is required, media has to be changed and *P. falciparum* culture will be harvested next day.

compared amongst themselves. In addition, the harvested iRBCs come from viable parasites that have been able to invade new uRBCs.

Schizont-enriched iRBCs purified (98% parasitaemia) and *P. falciparum* cultures obtained using the complete protocol can be used for biochemical and molecular analysis where the uRBCs interfere with the biological material coming from the parasite. Although the maximal parasitaemia achieved is around 40-50%, this could be enough for some studies. For example, it could be applied for MS/MS assays or the analysis of post-translational modifications where the minimal manipulations of parasites are required to avoid loss of modified proteins. The method could provide high quality material for this kind of studies and could be useful for identifying new drug targets in drug discovery, an increasing challenge for the majority of current anti-malarial discovery programmes mainly based on phenotypic screenings where the targets remain unknown.

ABBREVIATIONS

RBCs: Red blood cells

uRBCs: Uninfected red blood cells

iRBCs: Infected red blood cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Curtis Alan Engelhart and Neelan Keshwani for proofreading the manuscript and Julio Martin and Imanol Peña for their help in the conception, design, analysis, and interpretation of data. This work was supported by GSK Open Lab Foundation, MINECO-Spain grant BFU2011-28536 (MSR), and the Department of Industry of the Government of the Basque Country, Ertortek Research Programmes 2011/2012.

REFERENCES

- [1] WHO: WHO Expert Committee on Malaria. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000, 892 (i-v): 1-74.
- [2] Trager W, Jensen JB: Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research. Int J Parasitol. 1997, 2: 989-1006.
- [3] Schuster FL: Cultivation of *Plasmodium* spp. Clin Microbiol Rev. 2002, 15: 355-364. 10.1128/CMR.15.3.355-364.2002.
- [4] Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976, 193: 673-675. 10.1126/science.781840.
- [5] Trager W: *Plasmodium falciparum* in culture: improved continuous flow method. J Protozool. 1979, 26: 125-129. 10.1111/j.1550-7408.1979.tb02747.x.
- [6] Deponte M, Becker K: *Plasmodium falciparum*—do killers commit suicide?. Trends Parasitol. 2004, 20: 165-169. 10.1016/j.pt.2004.01.012.
- [7] Ginsburg H, Hoshen MB: Is the development of *falciparum* malaria in the human host limited by the availability of uninfected erythrocytes?. Malar J. 2002, 1: 18-10.1186/1475-2875-1-18.
- [8] Zolg JW, Macleod AJ, Scaife JG, Beaudoin RL: The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of *Plasmodium falciparum* in synchronized cultures. In Vitro. 1984, 20: 205-215. 10.1007/BF02618189.
- [9] Jensen MD, Conley M, Helstowski LD: Culture of *Plasmodium falciparum*: the role of pH, glucose and lactate. J Parasitol. 1983, 69: 1060-1067. 10.2307/3280864.
- [10] Mutai BK, Waitumbi JN: Apoptosis stalks *Plasmodium falciparum* maintained in continuous culture condition. Malar J. 2009, 2: 6
- [11] Dyer M, Day KP: Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2003, 68: 403-409.
- [12] Sims PFG, Hyde JE: Proteomics of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. PhD Expert Rev Proteomics. 2006, 3: 87-95. 10.1586/14789450.3.1.87.
- [13] Kwiatkowski D, Nowak M: Periodic and chaotic host-parasite interactions in human malaria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88: 5111-5113. 10.1073/pnas.88.12.5111.
- [14] O'donnell AJ, Schneider P, McWatters HG, Reece SE: Fitness costs of disrupting circadian rhythms in malaria parasites. Proc Biol Sci. 2011, 278: 2429-2436. 10.1098/rspb.2010.2457.
- [15] Lambros C, Vanderberg JP: Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979, 65: 418-420. 10.2307/3280287.
- [16] Rivadeneira EM, Wasserman M, Espinal CT: Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by percoll gradients. J Protozool. 1983, 30: 367-370. 10.1111/j.1550-7408.1983.tb02932.x.
- [17] Fernandez V: Separation of *Plasmodium falciparum* mature stages in percoll/sorbitol gradients. Methods in Malaria Research. Edited by: Moll K, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M. 2008, 26-27.
- [18] Trager W, Lanners HN: Initial extracellular development in vitro of merozoites of *Plasmodium falciparum*. J Protozool. 1984, 31: 562-567. 10.1111/j.1550-7408.1984.tb05503.x.
- [19] Vernot JP, Wasserman M: *Plasmodium falciparum* increased and multiple invasion during short periods of time. J Protozool. 1990, 37: 47-49. 10.1111/j.1550-7408.1990.tb01113.x.
- [20] Vogt A, Pettersson F: Selection of trophozoites by using magnetic cell sorting (MACS). Methods in malaria research. Edited by: Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. 2004, 31-33.

-
- [21] Egan TJ: Haemozoin formation. *Mol Biochem Parasitol.* 2008, 157 (2): 127-136. 10.1016/j.molbiopara.2007.11.005.
 - [22] Paul F, Roath S, Melville D, Warhurst DC, Osisanya JO: Separation of malaria-infected erythrocytes from whole blood: use of a selective high gradient magnetic separation technique. *Lancet.* 1981, 2: 70-71.
 - [23] Trang DT, Huy NT, Kariu T, Tajima K, Kamei K: One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells. *Malar J.* 2004, 3: 7-10.1186/1475-2875-3-7.
 - [24] Ahn SY, Shin MY, Kim YA, Yoo JA, Kwak DH, Jung YJ, Jun G, Ryu SH, Yeom JS, Ahn JY, Chai JY, Park JW: Magnetic separation: a highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 2008, 102: 1195-1200. 10.1007/s00436-008-0893-8.
 - [25] Ribaut C, Berry A, Chevalley S, Reybier K, Morlais I, Parzy D, Nepveu F, Benoit-Vical F, Valentin A: Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar J.* 2008, 7: 45-10.1186/1475-2875-7-45.
 - [26] Bhakdi SC, Ottinger A, Somsri S, Sratongno P, Pannadaporn P, Chiumma P, Malasit P, Pattanapanyasat K, Neumann HPH: Optimized high gradient magnetic separation for isolation of *Plasmodium*-infected red blood cells. *Malar J.* 2010, 9: 38-10.1186/1475-2875-9-38.
 - [27] Ribacke U, Moll K, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M: Growing *Plasmodium falciparum* cultures at high parasitaemia. *Methods in Malaria Research.* 2008, Manassas, Virginia: American Type Culture Collection, 8
 - [28] Karl S, Davis TME, St Pierre TG: Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes. *Malar J.* 2010, 9: 116-10.1186/1475-2875-9-116.
 - [29] Spadafora C, Gerena L, Kopydlowski KM: Comparison of the in vitro invasive capabilities of *Plasmodium falciparum* schizonts isolated by percoll gradient or using magnetic based separation. *Malar J.* 2011, 10: 96-10.1186/1475-2875-10-96.
 - [30] Bates AH, Mu J, Jiang H, Fairhurst RM, Su XZ: Use of magnetically purified *Plasmodium falciparum* parasites improves the accuracy of erythrocyte invasion assays. *Exp Parasitol.* 2010, 26: 278-280.
 - [31] Jensen JB, Trager W: Some recent advances in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *J Med Sci.* 1978, 14: 563-570.
 - [32] Raventos-Suarez C: *Plasmodium falciparum*: invasion and development in highly parasitized cultures. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1985, 21: 161-164. 10.1007/BF02621353.
 - [33] Radfar A, Méndez D, Moneriz C, Linares M, Marín-García P, Puyet A, Diez A, Bautista JM: Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitaemia levels. *Nat Protoc.* 2009, 4: 1899-1915.
 - [34] Research and Reference Reagent Resource Center (MR4).<http://www.mr4.org>
 - [35] Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL: *Plasmodium falciparum*: assessment of in vitro growth by [3H] hypoxanthine incorporation. *Exp Parasitol.* 1983, 55: 138-146. 10.1016/0014-4894(83)90007-3.
 - [36] Boyle MJ, Wilson DW, Richards JS, Riglar DT, Tetteh KKA, Conway DJ, Ralph SA, Jake Baum J, Beeson JG: Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107: 14378-14383. 10.1073/pnas.1009198107.

CAPÍTULO 2

Isolation of the Ubiquitin-Proteome from Tumor Cell Lines and Primary Cells Using TUBEs

Wendy Xolalpa¹, Lydia Mata-Cantero², Fabienne Aillet², and
Manuel S. Rodriguez³

Author details

¹Proteomics Platform CICbioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI, Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio, Spain.

²Ubiquitylation and Cancer Molecular Biology, Inbiomed, San Sebastián, Spain.

³IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS and ITAV, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 1 Place Pierre Potier, Oncopole entrée B, Toulouse, 31106, France. manuel.rodriguez@itav.fr.

Published in *Proteostasis: Methods and Protocols*, 2016, vol. 1449:161-75. DOI 10.1007/978-1-4939-3756-1_8

4.2. CAPÍTULO 2

Isolation of the Ubiquitin-Proteome from Tumor Cell Lines and Primary Cells Using TUBEs

ABSTRACT

Tandem ubiquitin-binding entities (TUBEs) act as molecular traps to isolate polyubiquitylated proteins facilitating the study of this highly reversible posttranslational modification. We provide here sample preparation and adaptations required for TUBE-based enrichment of the ubiquitin proteome from tumor cell lines or primary cells. Our protocol is suitable to identify ubiquitin substrates, enzymes involved in the ubiquitin proteasome pathway, as well as proteasome subunits by mass spectrometry. This protocol was adapted to prepare affinity columns, reduce background, and improve the protein recovery depending on the sample source and necessities.

KEYWORDS

TUBEs, Ubiquitylation, Isolation, Purification, Posttranslational modifications

1. INTRODUCTION

One of the most critical steps of the entire proteomic analysis procedure is sample preparation. Obtaining a 100% representation of proteins from a biological sample certainly does not occur in practice but the most efficient methods display a high number of representative cellular proteins. Preservation of posttranslational modifications (PTMs) of proteins such as phosphorylation, ubiquitylation, or SUMOylation adds another level of complexity to the sample preparation process due to the transient and labile nature of these PTMs. The covalent attachment of one or more ubiquitin moieties to a protein substrate (known as protein ubiquitylation) implies a great diversity of conjugating and de-conjugating enzymes [1, 2], resulting in a vast repertoire of ubiquitin chains on the target proteins [3]. Consequently, this PTM is involved in numerous and crucial cellular processes [4, 5]. Different strategies have been developed to face the challenging steps of enrichment and identification of endogenous ubiquitylated proteins (including histidine pull-down and immune affinity purification) [6– 8]. Tandem Ubiquitin Binding Entities are versatile research tools for the survey of the ubiquitin-proteasome pathway that have been successfully applied for the isolation and enrichment of polyubiquitylated proteins [9–11]. The fusion to a GST-tag allows a conventional affinity purification step by pull-down using glutathione-coupled beads. TUBEs have been demonstrated to be useful for isolation of ubiquitylated proteins from different biological sources such as cell lines, tissues, and organs [10]. Scaling up the pulldown protocol allowed the enrichment of protein samples for the study of global ubiquitylation events by mass spectrometry (MS) [12–14]. Besides the enrichment of ubiquitylated proteins in large scale, the pulldown protocol can also be suitable for the isolation of ubiquitin interacting partners to provide a more complete view of the ubiquitin proteome.

The method described here is adapted for the isolation and identification of the ubiquitin proteome by MS. TUBEs are prepared in columns to be used as affinity matrix for capturing ubiquitin-modified proteins and interacting partners. Binding, washing, and elution steps are checked to optimize the enrichment of

ubiquitylated proteins. Specific and background proteins are controlled at each step by Western blot (WB) analysis using an anti-ubiquitin antibody or gel staining in order to optimize protein recovery. The protocol should be adapted according to the source/type of biological sample since background can be increased by the presence of very abundant proteins in specific cell systems. If the aim is to isolate only ubiquitylated proteins, more stringent conditions and/or number of washes should be increased before elution to reduce the binding of nonspecific proteins. With the method described below, we have successfully isolated ubiquitylated proteins together with ubiquitin-interacting partners from tumor cell lines or primary cells such as mantle cell lymphoma (MCL) cells or red blood cells (RBCs), respectively [15]. The abundance of hemoglobin in RBCs requires specific adaptations to remove this sticky protein (indicated in detail in Subheading 4). As TUBEs are GST-fusion proteins, a GST control should be included in parallel with each sample to discriminate background from specific proteins. The method is divided into four sections: (1) coupling TUBEs/GST to glutathione beads, (2) cell lysis and sample clearance, (3) capturing and elution of proteins, and (4) sample concentration and gel electrophoresis. Figures 2.1 and 2.2 show a scheme of the general workflow.

2. MATERIALS

Prepare all solutions using ultrapure water (18 M Ω cm at 25 °C) and analytical grade reagents. Solutions are filtered and stored at 4 °C (unless indicated otherwise). Filtering should be done inside a hood to avoid contaminations. Diligently follow all waste disposal regulations when disposing waste materials. Sodium azide is not added to the reagents, therefore solutions should be prepared as fresh as possible.

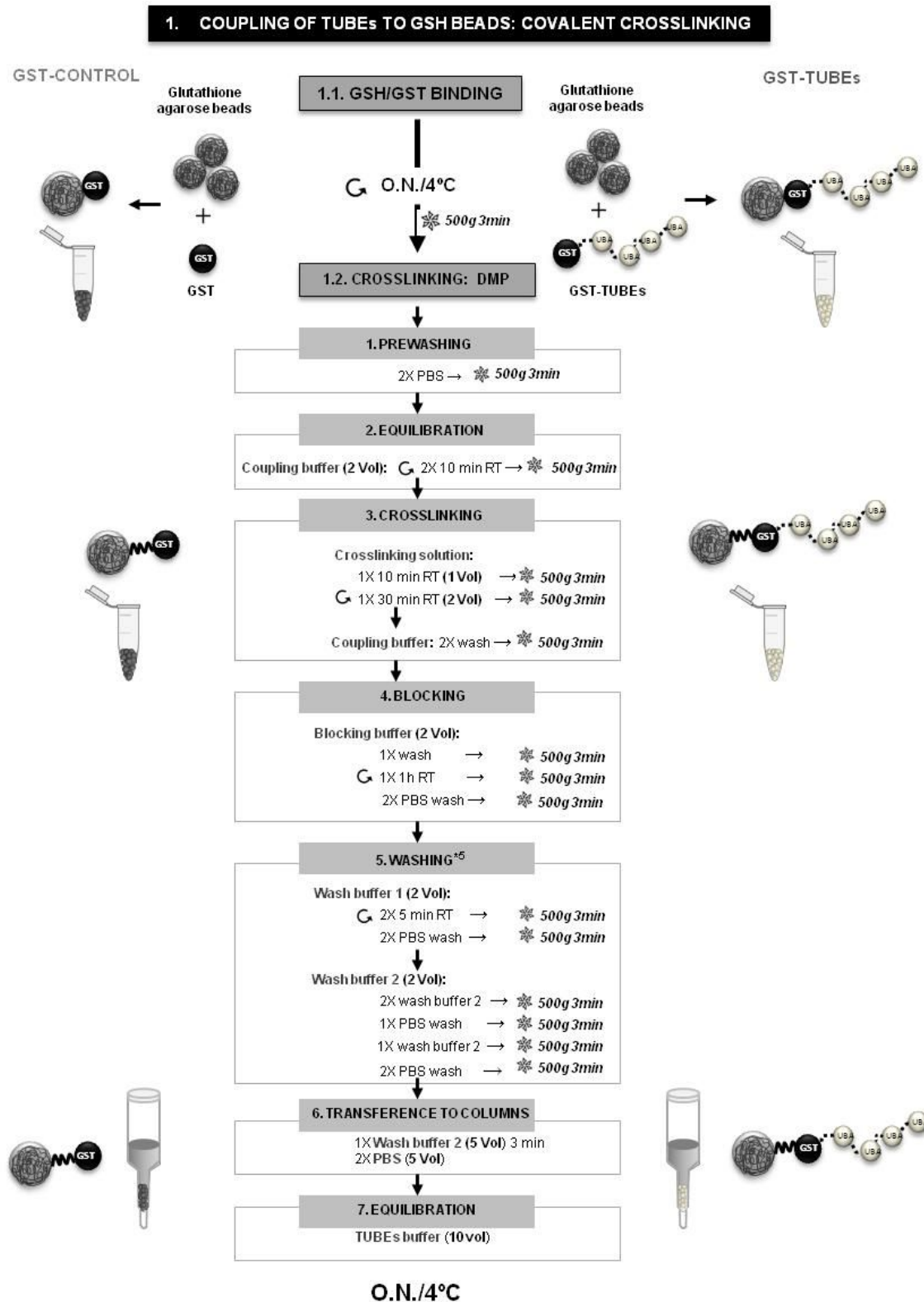


Figure 2. 1. Procedure to couple TUBE_s/GST to GSH-agarose beads. Before covalent cross-linking using DMP, molecular traps were bound to agarose beads. After blocking active groups with ethanolamine, several washes are applied to eliminate unbound molecular traps and non-covalent interactions. Superscript numbers are associated to Subheading 4.

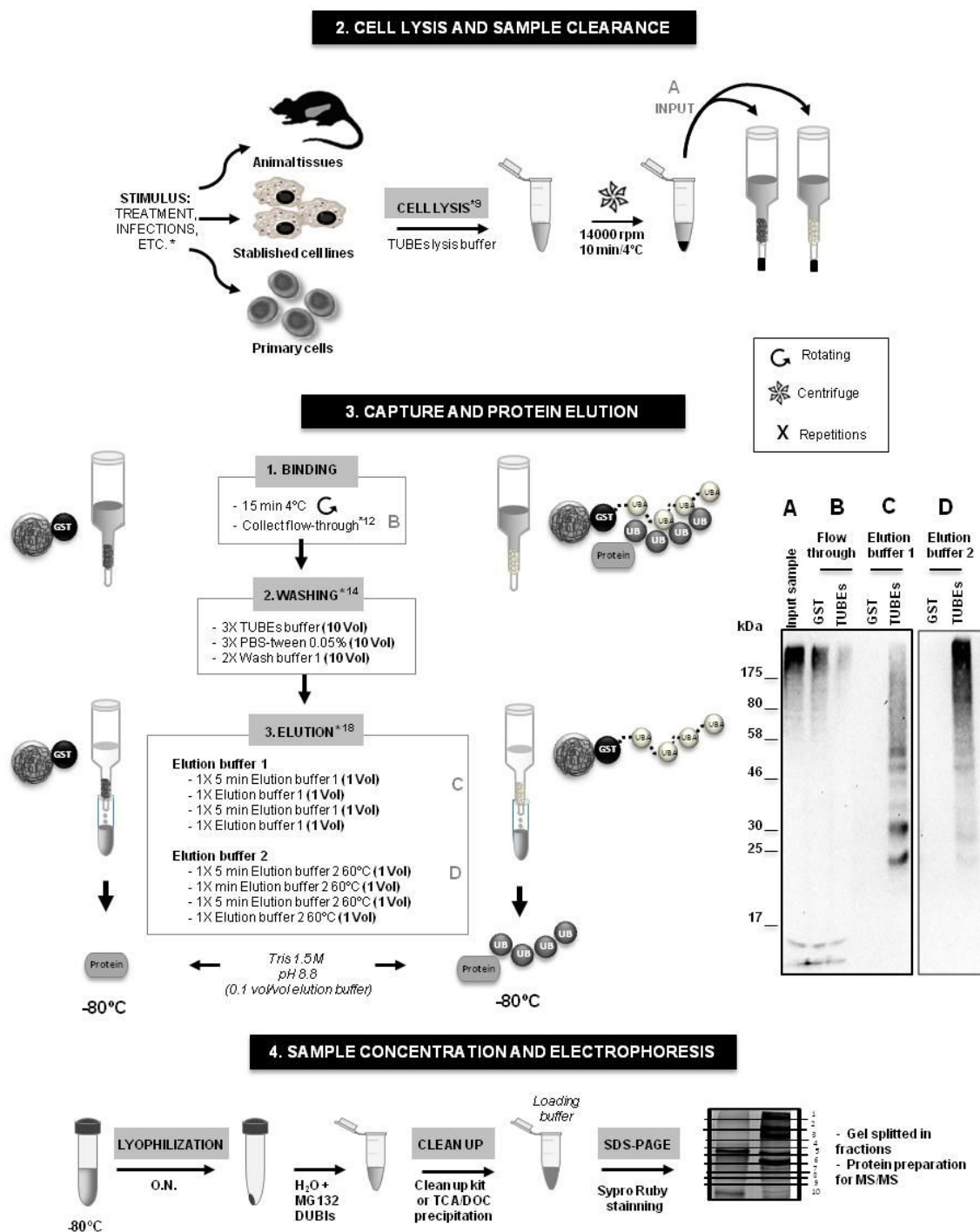


Figure 2. 2. Isolation of ubiquitylated proteins for MS analysis using TUBES. After lysis of biological samples, ubiquitylated proteins and associated factors are captured, eluted, and concentrated following the illustrated procedure (Captured and eluted proteins are monitored by Western blot with an anti-ubiquitin antibody). Superscript numbers are associated to Subheading 4.

2.1. Coupling TUBEs/ GST to Glutathione Beads

1. *Glutathione beads* (Biontex, Germany): Beads are previously washed twice with cold PBS and centrifuged at 2000 rpm during 15 min after each wash and kept at 4 °C until use.
2. Autoclaved PBS.
3. *TUBEs and GST proteins* are produced in *Escherichia coli* (C41-DE3) using a standard protocol for recombinant protein production [9] or can also be purchased through Life-Sensors Inc (Malvern, PA, USA).
4. **Coupling buffer:** 200 mM Borate buffer containing 3 M NaCl, pH 9. Boric acid (Sigma) is adjusted with NaOH, filtered by 0.22 µm membrane, and kept at room temperature. Do not store longer than a week as it precipitates.
5. **Cross-linking solution:** 50 mM Solution of dimethyl pimelimidate (DMP, Fluka) is prepared just before use. Dissolve DMP directly in coupling buffer at room temperature (RT).
6. **Blocking buffer:** 200 mM Ethanolamine (Sigma), pH 8.2. Carefully adjust pH with HCl in a fume hood. Filter and keep at 4 °C avoiding exposition to light by covering with aluminum foil.
7. **TUBEs buffer:** 20 mM Phosphate buffer pH 7.5 (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ from Sigma) containing 1% Igepal (Calbiochem), 2 mM EDTA (Sigma), 50 mM sodium fluoride (Sigma), 5 mM tetra-sodium pyrophosphate (Sigma), and 10 mM β-glycerol-2-phosphate (Sigma). Filter through 0.22 µm membrane and store at 4 °C.
8. **Washing buffer 1:** TUBEs buffer containing 1 M NaCl.
9. **Washing buffer 2:** 200 mM Glycine (Sigma) pH 2.5. Filter and store at 4 °C.
10. **PBS-Tween 0.05%** (Tween 20, Sigma).
11. Empty Poly-Prep ® Chromatography Columns 9 cm height (BioRad).
12. Rotating wheel for Eppendorf tubes (tube rotator).
13. Refrigerated centrifuge for Eppendorf tubes (swing rotor is optimal).

2.2. Cell Lysis and Sample Clearance

1. Tumor cell lines or primary cells are grown in appropriate medium. For MCL cells RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and 50 µg/mL penicillin-streptomycin were used.
2. Cold sterile PBS.
3. **TUBEs lysis buffer**: Supplement just before use TUBEs buffer with 1 mM PMSF (Sigma), complete mini-EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 50 µM DUB inhibitor PR619 (Calbiochem), and 200 nM proteasome inhibitor (Bortezomib, Velcade) (see Note 1). Keep on ice until needed.
4. Round-bottom sterile polypropylene tubes (13–15 mL) suitable for sonication.
5. Sonicator probe.
6. Cold centrifuge (4 °C).
7. Wet ice.

2.3. Capturing and Elution of Proteins

1. Gravity columns pre-packed with TUBEs cross-linked beads (described in Subheading 3.1).
2. **TUBEs buffer** (described in Subheading 2.1).
3. **Washing buffer 1**: TUBEs buffer containing 1 M NaCl (prepared in Subheading 2.1).
4. **PBS-Tween 0.05%** (prepared in Subheading 2.1).
5. **Elution buffer 1**: 200 mM Glycine pH 2.5 (same as washing buffer 2 in Subheading 2.1).
6. **Elution buffer 2**: 1% SDS (Sigma) prepared in PBS and warmed at 60 °C before use.
7. **1.5 M Tris-HCl, pH 8.8** (filter and store at RT).
8. Rotating wheel.

2.4. Sample Concentration and Gel Electrophoresis

1. 2D-Clean up Kit (GE Healthcare).
2. Ultrapure H₂O.
3. Lyophilizer.

4. Parafilm.
5. Vortex.
6. Bath sonicator.
7. Aspiration pump.
8. Loading buffer (Laemmli buffer).
9. Reagents and buffers for SDS-PAGE.
10. Pre-cast acrylamide mini gel (1.5 mm thick) and 5-well comb.
11. **Fixing solution:** 10% Acetic acid and 30% ethanol. Prepared in fresh.
12. **Destaining solution:** 7% Acetic acid, 10% ethanol. Prepared in fresh.
13. Sypro-Ruby protein gel stain (Invitrogen).
14. Wipe Tissue (Kimberly-Clark Professional).

3. METHODS

In order to reduce contaminants, affinity chromatography is performed within a clean hood using gloves during all the procedure. The method is divided into four sections:

3.1 Coupling TUBEs/ GST to Glutathione Beads: Covalent Cross-Linking

1. This step takes 2 days to be performed. If commercial TUBEs (Lifesensors) are already coupled to glutathione beads, start this procedure directly from Subheading 3.2. Never let the beads dry during any protocol step. Allow TUBEs or GST (control) binding to glutathione beads overnight (O/N) (Figure 2.1). For a large-scale purification, incubate 600–700 µg of TUBEs (see Note 2) with 600–700 µL of PBS-washed glutathione beads in a 2 mL Eppendorf tube (e.g., prepare 1300 µL of a 50% slurry glutathione-beads) (see Note 3). Adjust volume to submaximal tube capacity with PBS and incubate O/N at 4 °C using a wheel for rotating incubation.
2. After TUBEs or GST incubation with glutathione beads, centrifuge at $500 \times g$ for 3 min at 4 °C and remove supernatant (see Note 4).

3. Wash beads twice with PBS and centrifuge for 3 min at $500 \times g$. Discard supernatant by aspirating or remove carefully using a pipette to avoid losing beads.
4. Equilibrate beads by adding approximately 2 packed beads volumes (Vol) of coupling buffer. Centrifuge and discard supernatant. Add 2 Vol of coupling buffer and incubate beads for 10 min by rotating at RT.
5. Before cross-linking step, centrifuge as previously, discard supernatant, and add 1 Vol of fresh 50 mM DMP dissolved in coupling buffer (cross-linking solution). Incubate for 10 min at RT, centrifuge, discard supernatant and replace by 2 Vol. of cross-linking solution. Incubate for additional 30 min by rotating at RT.
6. Wash twice with coupling buffer to remove DMP. Centrifuge and discard supernatant as previously indicated.
7. To block active amino groups, wash beads with 2 Vol of blocking buffer, centrifuge, and discard supernatant. Add another 2 Vol of blocking buffer and incubate for 1 h rotating at RT.
8. Wash twice with cold PBS. 3.1 Coupling TUBEs/ GST to Glutathione Beads: Covalent Cross-linking Ubiquitin-Proteome Isolation Using TUBEs.
9. To remove non-coupled proteins, wash cross-linked beads twice with 2 Vol washing cold buffer 1. Incubate beads in each washing step 5 min by rotating at RT.
10. Wash with cold PBS twice.
11. Continue removing non-coupled protein by washing twice with 2 Vol of washing buffer 2. Do not incubate, only wash by inverting tube (see Note 5).
12. Wash once with PBS and once more with washing buffer 2.
13. Wash twice again with PBS and then transfer the cross-linked TUBEs beads to an empty polypropylene column. (If the procedure does not continue on the same day, keep beads in PBS at 4 °C in the Eppendorf tube). Coupled TUBEs beads should be used as fresh as possible.
14. For the affinity chromatography step, all procedures should be done in a cold room or in a cold cupboard to ensure that all materials, buffers, and beads stay cold. Wash the beads inside the column with 5 Vol of washing buffer 2. Close

column (bottom cap). Wait for 3 min and then open the bottom cap to discard the flow-through (FT).

15. Wash beads twice with 5 Vol of cold PBS (see Note 6).
16. Equilibrate beads into the column with 10 Vol of cold TUBEs buffer. Column is ready to use immediately with the lysed sample. (To check cross-linking efficacy, a sample of 10–20 μ L of cross-linked beads may be analyzed by SDS-PAGE or WB anti GST or anti-SV5) [9].

3.2. Cell Lysis and Sample Clearance

Cell lysis should be done on ice to avoid loss of protein modification and prevent other enzymatic activities. The time between the lysis and the incubation with the affinity column should be as short as possible. The following protocol has been performed with tumor cell lines or primary cells taking into account that the sample does not saturate the capacity of the coupled TUBEs beads to capture more than 80–90% of all ubiquitylated proteins present in the sample.

1. Cell culture maintenance: Mantle cell lymphoma (MCL) cells Z-138 are grown in suspension at 37 °C and 5% CO₂ humidity atmosphere. For protein extraction, around 50×10^6 cells are used for each condition or point (consider GST-bead control) (see Note 7). For a better manipulation and efficient cell lysis, each sample is splitted in two 13 mL round sterile tubes (25×10^6 cells each). Samples will be pooled later.
2. Cells are pelleted by 5-min centrifugation $300 \times g$ at RT. Wash cell pellet twice with 5 mL of cold PBS. Centrifuge and discard supernatant by aspiration (eliminate residual PBS as much as possible). Keep cell pellets on ice while performing lysis step.
3. Cell lysis (Figure 2.2): Prepare supplemented TUBEs lysis buffer just before use. Add 1 mL of TUBEs lysis buffer to each 25×10^6 cell pellet (see Note 8). While keeping samples on ice, disrupt cell pellet by three pulse sonication of 30 s each, and let cool between each pulse. The lysis step should be done as quickly as possible (see Note 9). Transfer the lysates to Eppendorf tubes and clarify sample by centrifuging at $20,000 \times g$ during 10 min at 4 °C. Recover and pool supernatants to evaluate the input for each experimental condition. Keep a

small sample for protein quantification. (Usually a lysate from 25×10^6 MCL Z-138 cell pellet resuspended in 1 mL contains about ≈ 2 mg/mL of total protein concentration, measured at A280nm.) Therefore, approximately 4 mg of total protein is applied to the TUBEs or GST columns (see Note 10).

3.3. Capturing of Ubiquitylated Proteins by Affinity Chromatography and Elution

Ubiquitylated proteins are often interacting with other protein factors, which could increase background level. For MS purposes, longer incubation times (>1 h) increase the presence of background proteins in the sample. Due to the high TUBEs affinity for poly-ubiquitin molecules (low nanomolar range) [9], the capture of ubiquitylated proteins is very efficient in a short time (30 min or less). According to the abundance of ubiquitylated proteins in the sample, the incubation time must be optimized to preserve specific proteins and discard nonspecific ones, also present in the GST control.

1. Before starting the chromatography, do not forget to keep 50 μ L of sample (input), mix with Laemmli buffer, and store at -20 °C. Analyze total ubiquitylated proteins by WB using anti-ubiquitin antibody.
2. Binding proteins to TUBEs column (Figure 2.2): Apply clarified lysates directly to respective column, TUBEs or GST-control, and be sure to close bottom cap before adding the lysate. Close also top cap and allow binding of ubiquitylated proteins to the beads. Incubate during 15–30 min at 4 °C (see Note 11). For a better capture, use a wheel to keep column in rotation.
3. After the binding step, set the column into a support. To collect the flow-through fraction (FT), open first top cap and then bottom cap before collection. Keep a FT sample and mix with Laemmli buffer as it was done with the input. Keep FT fraction for WB analysis to verify that TUBEs are not saturated and ubiquitylated proteins are not being lost (see Note 12).
4. Washing unbound proteins (Figure 2.2): Wash column three times with 10 Vol of TUBEs buffer. Close both sides of the column and mix by inversion. Set column in its support and discard wash flow (see Note 13).

5. Wash three times with 10 Vol PBS-Tween 0.05%, close column, and wash as in the previous step (see Note 14).
6. Eliminating non specific proteins: Before elution, wash beads twice with 10 Vol of washing buffer 1 (see Note 15).
7. Eluting proteins from column (Figure 2.2): Elution is performed in a sequential step: first, elute proteins with 1 Vol of elution buffer 1. Close the column, mix by flicking (do not invert), and wait for 5 min. Place column again in the support, open top and bottom caps, and collect the elution sample in a 15 mL tube (keep tube on ice to avoid ubiquitin deconjugation). Add again 1 Vol of elution buffer 1 to rinse column walls, and collect on the same tube. Add immediately to the eluted fraction 0.1 Vol of Tris 1.5 M, pH 8.8 to neutralize pH. Repeat this step once with elution buffer 1, collect and keep fraction on ice.
8. Second elution step using elution buffer 2 (pre-warmed at 60 °C): Add 1 Vol of elution buffer 2 and wait for 5 min mixing by flicking. Collect and apply 1 more Vol and collect in the same tube containing the previous eluted fraction. Repeat this step to recover tightly bound proteins (see Note 16). Neutralize eluted sample by adding Tris 1.5 M pH 8.8. Take care that the final Tris concentration does not exceed 100 mM.
9. Mix tube to homogenize eluted fractions and freeze immediately at –80 °C (see Note 17). Eluted samples can be stored at –80 °C until required MS analysis.
10. When optimizing your protocol, check also ubiquitylated proteins remaining on the beads by WB analysis. Transfer beads from column to Eppendorf tubes (with 1 Vol PBS). Drain PBS and add 300 µL of 3× Laemmli buffer.

3.4. Sample Concentration and Gel Electrophoresis

1. Lyophilization and reconstitution of samples (Figure 2.2): Keep the sample frozen until lyophilization starts. Make holes in the tube caps or replace caps with parafilm (with holes) before lyophilization. To preserve frozen samples during the lyophilization process, freeze them before in liquid nitrogen (NO₂). Lyophilize samples overnight (see Note 18).
2. Re-constitute sample in 500 µL ultrapure H₂O. To avoid ubiquitin deconjugation events, sample can be supplemented with proteasome and deubiquitylase

- inhibitors, 20 μ M MG132 and 50 μ M PR619, respectively. Mix samples by vortexing for 15 s and/or sonicate for 5 min in a sonicator bath (see Note 19).
3. Sample cleanup: Distribute sample in 100 μ L aliquots (see Note 20). Add to each aliquot 450 μ L of precipitant from 2D-clean up kit and incubate tube on ice for 15 min. Add 450 μ L of co-precipitant, mix the content by vortexing for 10 s, and centrifuge tubes at 15,000 \times g for 5 min (see Note 21). A pellet should be visible in the bottom of the tube (see Note 22). Carefully aspirate the supernatant with 1 mL blue tip. Briefly spin down the tubes and aspirate remaining liquid with a 200 μ L yellow tip. Add 20 μ L of H₂O over the pellet followed by 1 mL of chilled wash buffer and 5 μ L of wash additive. Vortex until the pellet gets in solution (see Note 23). Keep samples at -20°C , mix tubes for 30 s, and incubate again at -20°C . Repeat this action three times, incubate for 10–15 min between each vortex pulse, and keep samples O/N at -20°C . Centrifuge for 5 min at 15,000 \times g. Aspirate supernatant with a 1 mL blue tip. Spin down the tubes and aspirate the remaining liquid with a 200 μ L yellow tip. Leave the pellet to dry out for 30 s keeping tubes with open caps, do not overdry pellet.
 4. Resuspend the pellet in loading buffer. Add 80 μ L of 1 \times Laemmli buffer to the first tube aliquot and pipet up and down ten times. Take the liquid and transfer it to the next tube, repeat this procedure with all the tubes to pool into one sample. Then, apply additional 50 μ L of loading buffer and repeat sample transfer. The final sample volume should be of approximately 130 μ L.
 5. Mix protein sample by vortexing for 15 s and then boil during 5 min (repeat this twice). Keep 13 μ L of sample for WB analysis, the remaining material is loaded in an SDS-PAGE gel for MS analysis. Figure 2.3 shows typical results from MCL in A and B or *P. falciparum*-infected red blood cells (iRBC) in C and D.
 6. SDS-PAGE for mass spectrometry (Figure 2.3A and C): Buy or cast gel according to the required percentage of acrylamide:bisacrylamide. After boiling samples, load the total volume of samples immediately. Load molecular weight markers leaving a well space between samples to avoid contaminations (see Note 24). Run the gel at 80 V for 10–15 min to let samples get into the stacking gel. Then

increase the voltage to 125 V, for 10% gel run for about 30–60 min (see Note 25).

7. After gel electrophoresis, pry open the gel plates with the use of a clean spatula. Rinse the gel with pure MilliQ water and transfer carefully to a large glass petri dish.
8. Stain gel with Sypro-Ruby according to the manufacturer's instructions.
9. Perform de-staining step until a clean background is observed.
10. Document gel image in a digital imager.

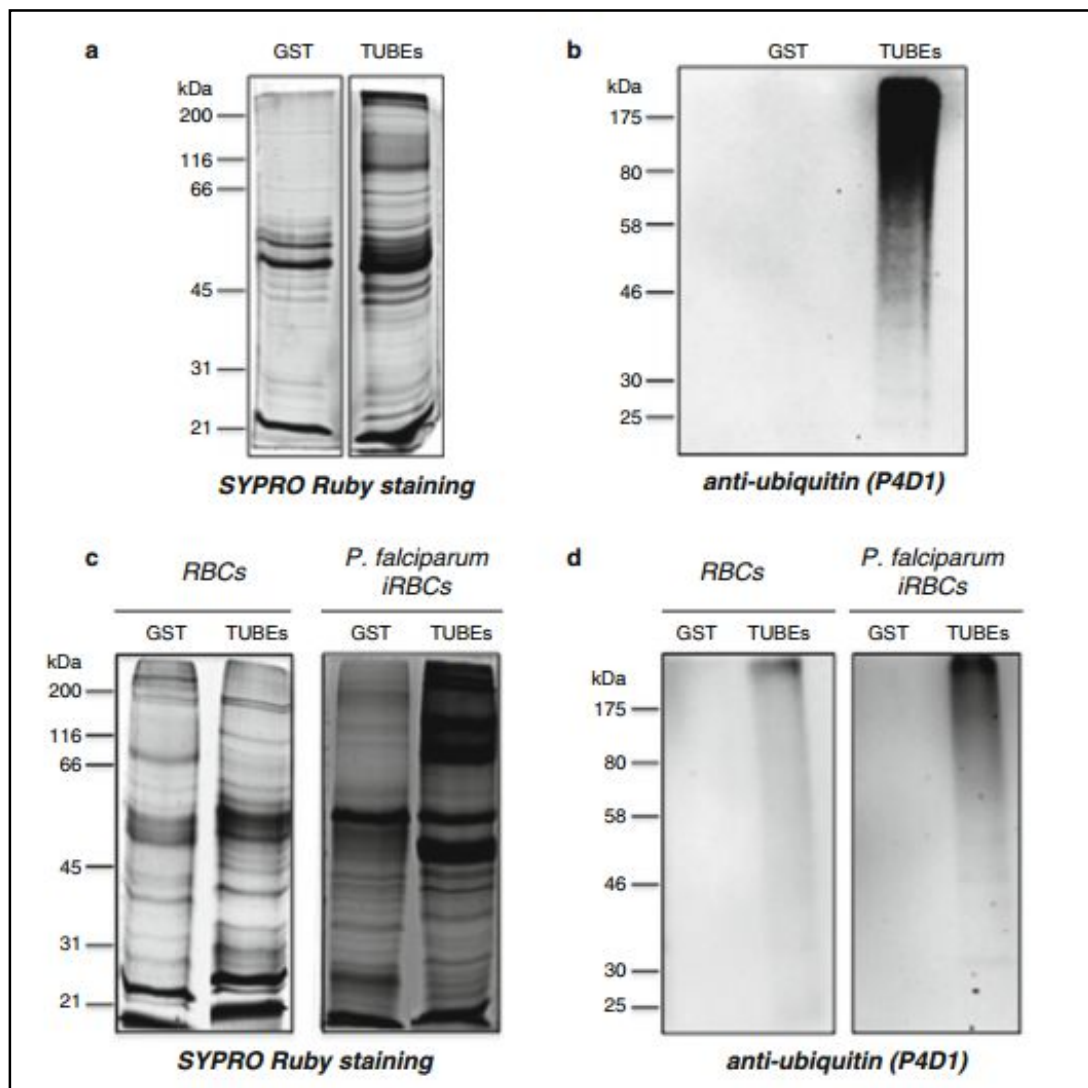


Figure 2. 3. Proteins captured by TUBEs for MS analysis. (a) SYPRO-stained gel, 10% acrylamide (90% of total sample from MCL cells). **(b)** WB detection of total ubiquitylated proteins (10% of total sample from MCL cells). **(c)** SYPRO-stained gel, 10% acrylamide (90% of total sample from non-infected RBCs and RBCs infected (iRBC) with *Plasmodium falciparum*). **(d)** WB detection of total ubiquitylated proteins (10% of total sample from RBC and iRBC). GST-coupled beads were used as control.

NOTES

1. Other proteasome inhibitors such as MG132 (20 μ M) can be used instead of Bortezomib.
2. The amount of TUBEs required to capture ubiquitylated protein from a given number of cells should be set up to avoid TUBEs saturation.
3. Add a slight excess of beads before the coupling step since after several washes a considerable amount of beads is lost.
4. During settings conditions, keep unbound fraction for WB analysis to verify that most ubiquitylated proteins were captured.
5. The pH of washing buffer 2 could alter GST binding capacity, so it is important to control incubation time with this solution.
6. Extra washes can be performed with SDS 1% preheated at 60 °C (elution buffer 2) to remove non-cross-linked proteins. It depends on the elution stringency that will be used to elute the sample.
7. Manipulate and scale the culture according to the biological sample since culture conditions are different for other cell types. The amount of cells used to isolate ubiquitylated proteins depends on the relative abundance of these proteins that will allow their optimal MS/MS detection. For example, around 2×10^9 RBCs are needed to capture ubiquitylated proteins with 700 μ g of TUBEs. The number of cells should be adjusted until no ubiquitylated proteins are detected in the flowthrough for a fixed amount of TUBEs.
8. During the sonication procedure, use 13 or 15 mL round bottom tubes to avoid overflow and cell extract warming. 13 mL tubes adjust much better into sonication tip allowing an efficient lysis. Do not forget to keep tubes on ice.
9. Lysis conditions should be set up for each biological sample. By reducing the lysis time ubiquitin de-conjugation/proteasomal degradation can be limited. No more than 15 min should be used.
10. There is not a direct correlation between total protein concentration and abundance of ubiquitylated proteins. Ubiquitylation can be altered according to stimuli, cellular process, or pathology. For instance, cells treated with proteasome inhibitors can accumulate ubiquitylated proteins. If protein

quantification is not possible, refer to cell number and set condition controlling by WB using anti-ubiquitin antibodies. This is the case for RBC lysates where hemoglobin interferes with standard techniques used to quantify protein concentration.

11. Do not incubate samples with beads for more than 15–30 min, otherwise the background (nonspecific proteins) will increase. Be sure to close the column tightly in both sides to avoid spills.
12. Flow-through can be passed through a new TUBEs column to avoid losing ubiquitylated proteins with weaker TUBEs affinity.
13. If desired, keep all washes to concentrate them by TCA/DOC precipitation and control unbound ubiquitylated proteins by WB analysis.
14. The number of washes and volumes may differ depending on the sample. For example, higher number of washes is required when working with RBCs due to the hemoglobin content.
15. For a RBC sample, the elution step started with the washing buffer 1. After a last wash with TUBEs buffer (10 Vol), add 1 Vol of washing buffer 1 (in this case this step is considered as elution). Close the column, mix, and wait for 5 min. Open column and collect the fraction. Add 1 more Vol of washing buffer 1 and collect the elution again.
16. During elution step, the number of repetitions or rounds using elution buffer 1 and 2 can be increased to recover tightly bound proteins. For example, the elution stringency is higher for RBCs. To detach ubiquitylated proteins, 2 elution rounds with washing buffer 1, 6 rounds with elution buffer 1, and 4 rounds with elution buffer 2 are required. To set up the number of rounds required to recover most ubiquitylated proteins, all fractions are analyzed by WB anti-ubiquitin.
17. The final elution volume is around 5 mL for MCL cells. To recover most ubiquitylated proteins 2 rounds with elution buffer 1 and 2 rounds with elution buffer 2 are required. Each round includes 2 Vol of approximately 600 uL/Vol.
18. Avoid large volumes or if necessary split sample before freezing. If needed, allow samples to dry out for more than a night.

19. Final suspension volume could be 500 μ L to maintain a limited number of aliquots for the cleanup step.
20. If you plan to use a kit for cleanup, scale the sample according to the manufacturer's instructions.
21. Large quantities of interfering substances can compromise protein precipitation in the sample. Therefore, precipitant and co-precipitant solutions are added in larger volumes than recommended by the kit manufacturer.
22. Sometimes the protein gets strongly attached to the Eppendorf wall and thus a pellet is not easily visible. Proceed with the cleanup protocol even if the pellet is not visible after the first centrifugation.
23. If precipitated protein sticks to the tube after washing buffer addition, carefully scratch the tube wall with a 200 μ L tip. If the proteins are not well detached, final precipitation will fail.
24. Separation between samples and markers is essential to avoid protein contamination when cutting gel slides.
25. Running time may change depending on the sample, buffer, size of the gel, etc. Check that no protein runs out of the gel by following the gel migration blue front.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Valérie Lang for the critical reading of this document, Gaël Roué for providing MCL cell lines, and Mikel Azkargorta and Felix Elortza for their technical support. This work was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain grant BFU2011-28536 (MSR), Diputación Foral de Gipuzkoa (MSR and FA), and GSK OPEN-LAB foundation. LMC was supported by the GSK OPEN-LAB foundation. The authors would like to acknowledge networking support by the Proteostasis COST Action (BM1307).

REFERENCES

1. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–479
2. Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82(2):373–428
3. Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81:203–229. doi: 10.1146/annurev-biochem-060310-170328
4. Xolalpa W, Perez-Galan P, Rodríguez MS et al (2013) Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Curr Pharm Des* 19(22):4053–4093
5. Mata-Cantero L, Lobato-Gil S, Aillet F, Rodriguez MS (2015) The ubiquitin proteasome system (UPS) as a cancer drug target: emerging mechanisms and therapeutics. In: Wondrak SL (ed) *Stress response pathways in cancer*. Springer Science + Business Media, Dordrecht, pp 225–264. doi: 10.1007/978-94-017-9421-3-11
6. Hjerpe R, Rodriguez MS (2008) Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans* 36:823–827
7. Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K et al (2005) Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics* 5(16):4145–4151
8. Schwertman P, Bezstarosti K, Laffeber C et al (2013) An immunoaffinity purification method for the proteomic analysis of ubiquitinated protein complexes. *Anal Biochem* 440(2): 227–236
9. Hjerpe R, Aillet F, Lopitz-Otsoa F et al (2009) Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep* 10:1250–1258
10. Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Hjerpe R et al (2012) Isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *Methods Mol Biol* 832:173–183. doi: 10.1007/978-1-61779-474-2_12
11. Rubel CE, Schisler JC, Hamlett ED et al (2013): a novel method for the identification of physiological E3 ubiquitin ligase substrates. *Cell Biochem Biophys* 67 (1): 127–138. doi: 10.1007/s12013-013-9624-6
12. Altun M, Kramer HB, Willems LI et al (2011) Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chem Biol* 18(11):1401–1412. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.08.018
13. Lopitz-Otsoa F, Rodriguez-Suarez E, Aillet F et al (2012) Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using tandem ubiquitin binding entities (TUBEs). *J Proteomics* 75(10):2998–3014. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.001
14. Shi Y, Chan DW, Jung SY et al (2011) A dataset of human endogenous ubiquitination sites. *Mol Cell Proteomics* 10(5):M110.002089. doi: 10.1074/mcp.M110.002089
15. Mata-Cantero L, Azkargorta M et al (2016) New insights into host-parasite ubiquitin proteome dynamics in *P. falciparum* infected red blood cells using a TUBEs-MS approach. *J Proteomics* 29(139):45–59. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.004.

CAPÍTULO 3

New insights into host-parasite ubiquitin proteome dynamics in *P. falciparum* infected red blood cells using a TUBEs-MS approach

Mata-Cantero L^{1,2,3}, Azkargorta M², Aillet F^{2,3}, Xolalpa W^{2,3},
LaFuente MJ¹, Elortza F², Carvalho AS⁴, Martin-Plaza J⁵,
Matthiesen R⁴, Rodriguez MS^{2,3,6}

Author details

¹Medicines Development Campus, Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline Tres Cantos, Madrid, Spain

²Proteomics Platform CICbioGUNE, CIBERehd, ProteoRed-ISCI, Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio, Spain.

³Ubiquitylation and Cancer Molecular Biology, Inbiomed, San Sebastian, Spain.

⁴Computational and Experimental Biology Group, Health Promotion and Chronic Diseases Department, National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, Lisbon, Portugal.

⁵Centro de Investigación Básica, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain.

⁶Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France, University of Toulouse III-Paul Sabatier, 31077 Toulouse, France, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France.

Published in *Journal Proteomics*, 2016, 139:45-59. doi: 10.1016/j.jprot.2016.03.004.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916300598#gr1>

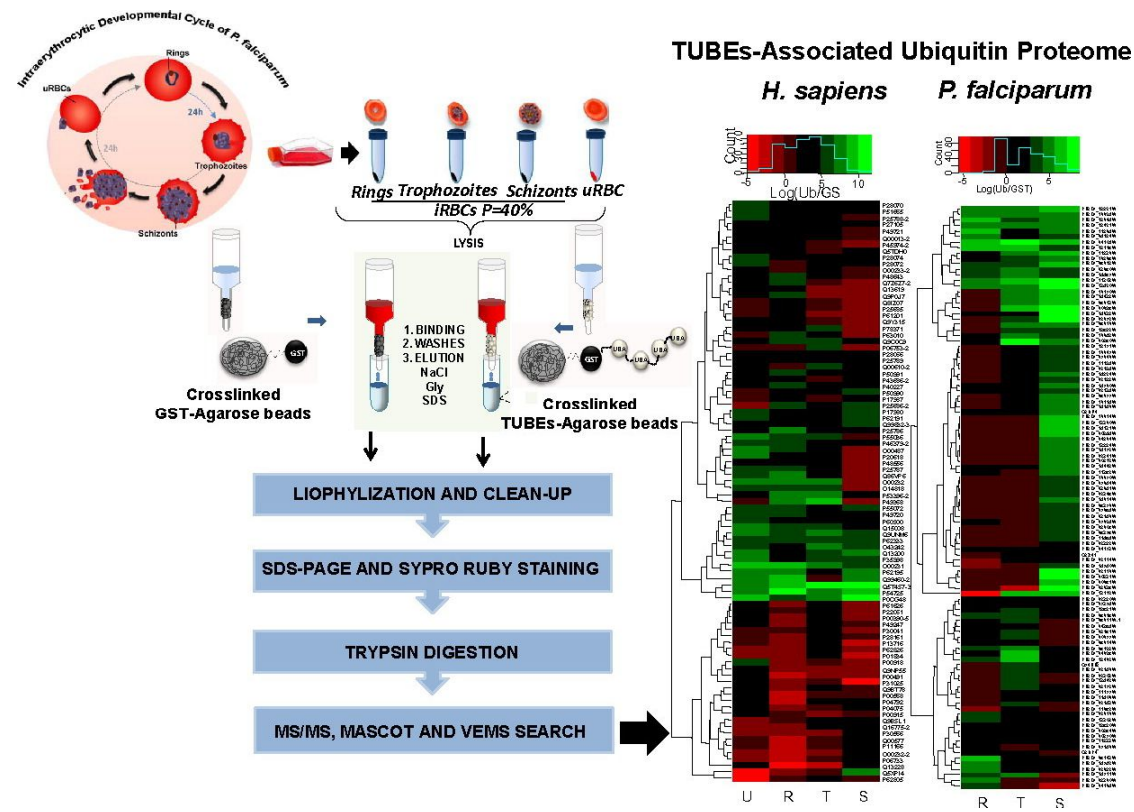
4.3. CAPÍTULO 3

New insights into host-parasite ubiquitin proteome dynamics in *P. falciparum* infected red blood cells using a TUBEs-MS approach

HIGHLIGHTS

- Host-parasite proteasome displayed reverse regulation.
- Significant TUBE enrichment of proteins in Maurer's clefts.
- Ubiquitylation of REX1 peaks in trophozoites stage.
- K11 and K48 was the most frequently identified polyubiquitylation sites.
- Functional aspects of host-parasite ubiquitin proteome dynamics were characterized.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Malaria, caused by *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), ranks as one of the most baleful infectious diseases worldwide. New antimalarial treatments are needed to face existing or emerging drug resistant strains. Protein degradation appears to play a significant role during the asexual intraerythrocytic developmental cycle (IDC) of *P. falciparum*. Inhibition of the ubiquitin proteasome system (UPS), a major intracellular proteolytic pathway, effectively reduces infection and parasite replication. *P. falciparum* and erythrocyte UPS coexist during IDC but the nature of their relationship is largely unknown. We used an approach based on Tandem Ubiquitin-Binding Entities (TUBEs) and 1D gel electrophoresis followed by mass spectrometry to identify major components of the TUBEs-associated ubiquitin proteome of both host and parasite during ring, trophozoite and schizont stages. Ring-exported protein (REX1), a *P. falciparum* protein located in Maurer's clefts and important for parasite nutrient import, was found to reach a maximum level of ubiquitylation in trophozoites stage. The *Homo sapiens* (*H. sapiens*) TUBEs associated ubiquitin proteome decreased during the infection, whereas the equivalent *P. falciparum* TUBEs-associated ubiquitin proteome counterpart increased. Major cellular processes such as DNA repair, replication, stress response, vesicular transport and catabolic events appear to be regulated by ubiquitylation along the IDC *P. falciparum* infection.

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

In this work we analyze for the first time the interconnection between *Plasmodium* and human red blood cells ubiquitin-regulated proteins in the context of infection. We identified a number of human and *Plasmodium* proteins whose ubiquitylation pattern changes during the asexual infective stage. We demonstrate that ubiquitylation of REX1, a *P. falciparum* protein located in Maurer's clefts and important for parasite nutrient import, peaks in trophozoites stage. The ubiquitin-proteome from *P. falciparum* infected red blood cells (iRBCs) revealed a significant host-parasite crosstalk, underlining the importance of ubiquitin-regulated proteolytic activities during the intraerythrocytic developmental cycle (IDC) of *P. falciparum*. Major cellular processes defined from gene ontology such as DNA repair, replication, stress response, vesicular transport and catabolic events appear to be regulated by ubiquitylation along the IDC *P. falciparum* infection. Given the importance of ubiquitylation in the development of infectious diseases, this work provides a number of potential drug-target candidates that should be further explored.

KEYWORDS

Malaria, Ubiquitin, TUBEs, *Plasmodium falciparum*, Mass spectrometry, Drug targets

1. INTRODUCTION

Malaria rates as one of the deadliest diseases in the world with annual reports of more than 300 million clinical cases and cause of over 2 million deaths [1]. The protozoan parasite *P. falciparum* causes the most severe form of Malaria. *P. falciparum* has a complex multistage life cycle, with sexual reproduction in the *Anopheles* mosquito and asexual stage within the *H. sapiens* host, where it develops in the liver and erythrocytes (Figure 3.1A). The IDC of the malaria parasite is the primary target for anti-malarial drug development as it is associated with pathogenesis [2] and [3]. IDC studies highlighted the importance of protein post-translational modifications (PTMs) for the parasite's progression throughout its life cycle. One of the most relevant PTMs is ubiquitin conjugation (also known as ubiquitylation) [4], [5], [6], [7], [8] and [9]. Ubiquitylation of proteins across eukaryotes is mediated by a three step thiol-ester cascade of reactions implicating an ubiquitin-activating enzyme (E1), an ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and a specific ubiquitin-protein ligase (E3) that will recognize each substrate. Ubiquitylation occurs mainly on lysine residues of the protein substrates or on any of the seven active lysine residues of ubiquitin, leading to the formation of different polyubiquitin chains [10]. Ubiquitylation reverse reactions are controlled by deubiquitylating enzymes (DUBs).

The specificity of the UPS components and the large repertoire of processes in which it is involved, make protein ubiquitylation a promising source of suitable targets for drug development [10], [11] and [12]. The pharmaceutical potential of the UPS has been recognized with the successful use of proteasome inhibitors in the treatment of some types of cancer [10], [11] and [12]. The inhibition of proteasome factors or DUBs is likely to result in the accumulation of cellular factors critical for the regulation of cell cycle, survival and apoptosis [10], [11] and [12].

The suitability of the UPS as anti-malarial drug target was demonstrated with the use of proteasome inhibitors which impair parasite growth including multidrug resistant strains and gametocytes [13], [14], [15], [16] and [17]. These findings underlined the importance of the UPS on the maintenance and

propagation of the malaria parasite, encouraging the identification of *P. falciparum* protein targets of ubiquitylation that could be important for its survival. Little is known about the *P. falciparum* UPS, despite the above mentioned knowledge of the effect of proteasome inhibitors. First studies were *in silico* proteomic analysis that identified proteins containing domains related with the ubiquitin system [7]. Over 100 putative proteins related with the ubiquitin proteasome system were found, such as 9 members of the ubiquitin family including NEDD8, URM1, HUB1, ATG8 and SUMO, eight E1 activating enzymes, fourteen E2 conjugating enzymes, fifty-four E3 ligases belonging to HECT, RING, PHD and U-box families and twenty-nine DUBs. *P. falciparum* E1 and E2 proteins show a high degree of conservation in contrast to E3 ligases and DUBs. For this reason, E3 ligases are considered good drug targets due to the low similarity with the human counterpart and because they can be targeted for inhibition as demonstrated in humans [12]. However, only a small number of them have been confirmed experimentally such as *PfUCH54* [18]. *In silico* models were undertaken to identify ubiquitylated proteins by predicting ubiquitylation sites [19]. These studies showed a putative ubiquitylation in around 70% of the *P. falciparum* proteome, which is more than in other eukaryotic species. Approaches based on the identification of individual protein targets revealed actin [20] and histone H2B [21] as ubiquitin substrates. Global approach combining *in silico* prediction models and tandem mass spectrometry (MS/MS) were undertaken to identify and characterize multiple components of the ubiquitin-protein degradation pathway of *P. falciparum* [19] and [22]. However, this study was performed using isolated parasites, leaving the interconnection between the *H. sapiens* and *P. falciparum* UPS unexplored [8] and [14]. The UPS has been frequently associated with host-pathogen interactions since it is implicated in antigen processing and host immune system bypass [14]. Furthermore, *P. falciparum* modifies the host proteome by completely transforming the infected red blood cells (iRBC) into a niche where it can grow. This includes a continuous export of proteins through the parasite membrane, the parasitophorous vacuole and host membrane, to change surface proteins and sequester nutrients present in the bloodstream.

Proteasome inhibitors also target the host proteasome and are therefore not specific for *P. falciparum*. Consequently, information of precise regulation of UPS factors preferably specific to *P. falciparum* will comprise a set of potential drug targets. We therefore combined enrichment of ubiquitylated proteins with mass spectrometry (MS) based identification for defining UPS factors specific for *P. falciparum* and to address the precise regulation of these factors.

The enrichment and MS identification of ubiquitylated proteins is hampered by their inherent instability, stemming from both proteasomal degradation and de-conjugation by DUBs [23]. Several methods have been developed to isolate and identify ubiquitylated proteins, including the use of efficient but expensive immunoprecipitating antibodies [24], or exogenous expression of histidine-tagged ubiquitin that allows the use of guanidinium and urea denaturing conditions [23]. Tandem Ubiquitin-Binding Entities (TUBEs) were developed to increase affinity for ubiquitin chains with respect to a single ubiquitin binding domain and also to protect ubiquitylated proteins from proteasome and DUBs proteolytic activities during the cell lysis [25]. TUBEs are fused to a Glutathione-S-Transferase (GST) tag to allow the purification of ubiquitylated proteins and their associated ubiquitin proteome by conventional pull down before MS analysis [26], [27], [28], [29] and [30]. In this study, TUBEs have been used to simultaneously identify the major TUBEs associated ubiquitin proteome of *P. falciparum* and *H. sapiens* along the parasite IDC (Figure 3.1A). The obtained interactome of the ubiquitin proteome is composed of ubiquitylated proteins as well as interacting factors from both host and parasite. The results shed novel light on the role of UPS during different intraerythrocytic stages of the infection. Biologically relevant proteins that could represent potential targets for vaccine/drug development were part of the isolated and MS identified ubiquitin proteome.

2. METHODS

2.1. Reagents

EDTA, sodium phosphate dibasic, Na_2HPO_4 , monosodium phosphate, NaH_2PO_4 , sodium dodecyl sulphate, SDS, TrisHCl, NaCl, Tween 20, sodium pyrophosphate, glycerol-2-phosphate, glutathione-agarose beads, ethanolamine, glycine, dimethyl pimelidate, DMP, sorbitol, percoll, phenylmethylsulfonyl fluoride PMSF, MG132 and hypoxanthine were purchased from Sigma-Aldrich. Boric acid and deubiquitylases inhibitor PR619 were purchased from Merck, NP-40 from Calbiochem, PBS from Oxoid, sodium fluoride NaF from Panreac. AlbuMAX II and RPMI 1640 medium (Gibco) were purchased from Invitrogen. Complete mini EDTA protease inhibitor cocktail was obtained from Roche.

2.2. Antibodies

P4D1 is a mouse monoclonal anti ubiquitin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-*Pf*HSP90 (SPC-187C/D) is a rabbit polyclonal antibody (Biosciences Inc). Anti-HSP40/DNAJ (C-Term) is a rabbit polyclonal antibody (ABIN 361684) from antibodies-on-line.com. *P. falciparum* aldolase (Ab38905) is a rabbit polyclonal HRP conjugated antibody from Abcam. Anti-RPN7/S10a (BML-PW8225) and anti-RPN10/S5a (BML-PW9250) are polyclonal antibodies from Enzo Life Sciences. HUWE polyclonal antibody is a kind gift from Dr. S. Wing [31]. REX1 antibody was generously provided by Dr. D. Gardiner and Dr. K. Trenholme [32] and [33].

2.3. Synchronized and high parasitaemia *P. falciparum* culture

P. falciparum 3D7 strain (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center) was maintained in culture with RBCs (obtained from the Spanish Red Cross Blood Bank with donors consent) as described by Trager and Jensen [34] and [35]. Cells were grown at 1% parasitaemia and 1% haematocrite in RPMI 1640 medium supplemented with 5% AlbuMAX II, and 150 μM hypoxanthine (complete medium), under 5% CO_2 , 90% N_2 and 5% O_2 atmosphere

at 37 °C. iRBCs at 40% of parasitaemia and different *P. falciparum* intraerythrocytic stages were prepared as previously described [36]. 2×10^9 iRBCs at 40% parasitaemia were used by replicate and IDC stage for further ubiquitylated proteins capture using GST or TUBEs crosslinked to agarose beads [27]. Briefly, cells were grown in 100 ml of culture media at 2% parasitaemia and 0.8% parasitaemia for three days after synchronization with 5% w/v sorbitol. An additional synchronization cycle with 70% percoll gradient (v/v) was carried out and cultures were maintained for two days prior to iRBCs purification by magnetic columns (vario MAC). Approximately 4×10^8 iRBCs with schizonts at around 98% parasitaemia were obtained and adjusted to 0.2% haematocrit and 10% of parasitaemia with complete media and fresh uRBCs. Cultures were grown for 18, 32 or 42 h depending of the stage required, rings, trophozoites or schizonts, respectively. *P. falciparum* cultures with 4×10^9 at 40% of parasitaemia were pelleted at $600 \times g$ for 5 min, 4 °C and washed twice with PBS with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and complete mini-EDTA free anti-proteases. The number of harvested RBCs in culture was determined with a Neubauer chamber. MG132 and deubiquitinase inhibitor PR619 were added to the pellet containing RBCs to a final concentration of 20 μ M and 50 μ M respectively, and incubated for 5 min before storage at – 80 °C. Regarding the uRBCs used as control, fresh blood was maintained at 0.2% haematocrite for 24 h reproducing the conditions used for the iRBCs. uRBCs were harvested and counted as described for iRBCs cultures.

2.4. Fractionation of *P. falciparum* iRBC (Western blot assays)

uRBCs and iRBCs at different intraerythrocytic stages (rings, trophozoites and schizonts) were obtained as previously described (see above). Pellets were thawed and treated with 0.1% w/v saponin in cold PBS to release the parasite as previously described [37]. Pellets were then centrifuged 5 min at 3500 rpm, 4 °C to separate human proteins from the parasite. Supernatants were preserved and the human fraction was analyzed. Pellets containing the parasite were washed 6 times with 1 ml of PBS until the supernatant was clear of hemoglobin and host proteins contamination. Pellets were then resuspended in 500 μ l TUBEs-Buffer (see section 2.6) containing proteases inhibitors (mini-tablet anti-proteases, Roche) and

samples sonicated 6 times (10 s at 10 μ m and kept on ice between each sonication). After 10 min centrifugation at 13,000 rpm, 4 °C, supernatants were mixed vol/vol with Laemmli buffer. Total extracts were analyzed by Western-blot using either specific *P. falciparum* or *H. sapiens* antibodies.

2.5. Expression and purification of GST and GST-TUBEs

TUBEs and GST proteins were expressed and purified following previously reported method [25]. Alternatively, TUBEs can be purchase from LifeSensors. Briefly, both TUBEs and GST proteins were expressed in *Escherichia coli* C41 (DE3) for 6 h at 20 °C, after the addition of 1 mM IPTG. Pelleted bacteria were lysed by sonication in PBS, 1% Triton X-100 and 2 mM benzamidine. Lysates were clarified by centrifugation for 2 h at 20,000 rpm, 4 °C. Proteins were purified by first incubating the lysate with glutathione agarose beads for 2 h at 4 °C according to the manufacturer instructions. After washing agarose beads with PBS-1% Triton X-100, TUBEs or GST proteins were eluted with glutathione in 50 mM Tris-HCl pH 9.5. Proteins were concentrated and buffer exchanged to PBS (Amicon Ultra Centrifugal Filter cut off 3 kDa). Protein concentration was determined measuring UV absorbance at 280 nm.

2.6. Crosslinking of the GST and GST-TUBEs to glutathione agarose beads

Crosslinking and isolation of ubiquitylated proteins were performed using the protocol described in *Xolalpa et al.* [27] adapted to *P. falciparum* iRBCs. Glutathione agarose beads were washed three times with PBS following the manufacture instructions, and incubated overnight with GST or GST-TUBEs in PBS at 50%. The amount of GST or GST-TUBEs required per replicate was 700 μ g in 700 μ l of glutathione agarose beads (100%). GST-agarose beads and TUBEs-agarose beads were centrifuged at 500 $\times g$ for 3 min and washed twice with PBS. Beads were equilibrated washing twice with coupling buffer containing 200 mM boric acid and 3 M NaCl (pH 9). Agarose beads were then incubated for 30 min at room temperature with 50 mM of DMP in coupling buffer for crosslinking with GST

or GST-TUBEs. Crosslinked beads were washed three times with coupling buffer and thoroughly washed to remove non crosslinked GST or GST-TUBEs. Following, crosslinked beads were washed twice with 1 M NaCl in TUBEs buffer (50 mM NaF, 5 mM tetra-sodium pyrophosphate, 10 mM β -glyceropyrophosphate, 0.2% NP-40, 2 mM EDTA, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4), washed twice with PBS, three times with 200 mM glycine pH 2.5 and finally three times with PBS. Glycine and PBS wash steps were repeated once more and beads were stored overnight at 4 °C. Prior to ubiquitylated proteins purification, crosslinked beads were packed into polyprep columns (Biorad). Glycine and PBS wash steps followed by 0.2% SDS (preheated at 60 °C) were repeated twice. The incubation time per wash was 5 min. Washes were repeated two additional times and the columns washed twice with PBS. Finally columns were equilibrated with TUBEs buffer.

2.7. Purification of ubiquitylated proteins with TUBEs

4×10^9 iRBCs or uRBCs per replicate were thawed in lysis buffer (TUBEs buffer, 1 mM PMSF, 50 μM deubiquitylase inhibitor PR619, complete mini EDTA protease inhibitor cocktail and 20 μM MG132) and lysed by six cycles of sonication (10 s sonicating and 3 min, on ice). Lysates were clarified by centrifuging for 10 min at $20,000 \times g$, 4 °C and the supernatant split in two. One part was added to the column with previously crosslinked glutathione agarose beads with TUBEs (see above) to purify ubiquitylated proteins, and the other part was added to crosslinked GST beads as control. Binding was carried out incubating the samples for 15 min at 4 °C with rotation. Crosslinked agarose beads in the columns were washed to remove unbound proteins by washing with 13 volumes (packed beads) of TUBEs buffer, 10 volumes of PBS-Tween 0.05% and equilibrated with TUBEs buffer. To elute TUBEs or GST bound proteins, the crosslinked beads were eluted twice with 1 M NaCl, six times with 200 mM glycine pH 2.5 and finally with 1% SDS preheated at 60 °C. Eluted fractions were pooled, equilibrated with TrisHCl 1.5 M pH 8.8 and stored at – 80 °C until MS/MS analysis.

2.8. Protein sample preparation and SDS-PAGE

Sample preparation for MS/MS, tryptic digestion and data analysis were performed as described in *Azkargorta et al.* [28]. Samples were lyophilized on a Benchtop SLC lyophilizer (Virtis), and resuspended in water before addition of 20 μ M PR619 and 20 μ M MG132. Samples were precipitated using the 2D-Clean Up Kit (GE Healthcare), and resuspended in a buffer containing 50 mM Tris, pH 6.8, 5% glycerol, 1.67% β -mercaptoethanol, 1.67% SDS and 0.0062% bromophenol blue. Protein samples were boiled for 5 min and resolved in 12.5% acrylamide gels, using a Mini-Protean II electrophoresis cell (Bio-Rad). A constant voltage of 150 V was applied for 45 min. Gels were fixed in a solution containing 10% acetic acid, 40% ethanol for 30 min, and stained overnight in SYPRO Ruby (Bio-Rad). Gels were then washed in a solution containing 10% ethanol and 7% acetic acid for 30 min, and the image was acquired using a Typhoon Trio scanner (GE Healthcare). Each lane was subjected to tryptic digestion, followed by LC-MS/MS analysis.

2.9. Tryptic digestion

Gel bands were sliced into 10 small pieces as accurately as possible to guarantee reproducibility. The slices were subsequently washed in Milli-Q water. Reduction and alkylation were performed using dithiothreitol (10 mM DTT in 50 mM ammonium bicarbonate) at 56 °C for 20 min, followed by iodoacetamide (50 mM iodoacetamide in 50 mM ammonium bicarbonate) for another 20 min in the dark. Gel pieces were dried and incubated with trypsin (12.5 μ g/ml in 50 mM ammonium bicarbonate) for 20 min on ice. After rehydration, the trypsin supernatant was discarded. Gel pieces were hydrated with 50 mM ammonium bicarbonate, and incubated overnight at 37 °C. After digestion, acidic peptides were extracted with TFA 0.1% and dried out in a RVC2 25 speedvac concentrator (Christ). Peptides were resuspended in 10 μ l 0.1% FA and sonicated for 5 min prior to analysis.

2.10. NanoLC-MS/MS and data analysis

Peptide mixtures obtained from trypsin digestion were separated by online nanoLC and analyzed by electrospray tandem mass spectrometry. Peptide separation was performed on a nanoAcquity UPLC system (Waters) connected to an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Electron). Approximately 40% of each sample was loaded onto a Symmetry 300 C18 UPLC Trap column, 180 $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$, 5 μm (Waters). The precolumn was connected to a BEH130 C18 column, 75 $\mu\text{m} \times 200 \text{ mm}$, 1.7 μm (Waters) equilibrated in 3% acetonitrile and 0.1% FA, and peptides were eluted at 300 nl/min using a 60 min linear gradient of 3–50% acetonitrile directly onto the nanoelectrospray ion source (Proxeon Biosystems). The mass spectrometer automatically switched between MS and MS/MS acquisition in DDA mode. Survey full scan MS spectra (m/z 400–2000) were acquired in the orbitrap with a resolution of 30,000 at m/z 400. The 6 most intense ions were sequentially subjected to collision-induced dissociation (CID) fragmentation in the linear ion trap. Precursors with charge states of 2 and 3 were specifically selected for CID. Collision-energy applied to each peptide was automatically normalized as a function of the m/z and charge state. Analyzed peptides were excluded for further analysis during 30 s using dynamic exclusion lists. Searches were performed using Mascot Search engine (Matrix Science) on Proteome Discoverer 1.2. software (Thermo Electron). Carbamidomethylation of cysteines as fixed modification, oxidation of methionines and gly-gly and leu-arg-gly-gly tags on lysine residues as variable modifications, 5 ppm of peptide mass tolerance, and 0.5 Da fragment mass tolerance were adopted as search parameters. 2 missed cleavages were allowed. Spectra were searched against a mixed *H. sapiens*/*P. falciparum* database (45,428 entries) coming from UniprotKB/Swiss-Prot and TrEMBL version 2012_09 (538010 and 26079526 entries). A false discovery rate estimation procedure was applied for peptide identification and only proteins with at least two peptides passing FDR < 5% cutoff were considered as reliable hits. Protein identifications obtained for each sample (10 slices) were collapsed in a single list, and the spectral counts obtained for each protein in TUBEs and GST samples were compared. This comparison was performed independently in each of the replicates for each stage. Proteins with a ratio of at

least 1.5 fold spectral difference in TUBEs compared to GST in two out of two biological replicas, for a specific stage (uRBCs, Rings, Trophozoites, Schizonts), were considered as enriched by TUBEs (Supplementary Table 3.S1).

The statistical sampling of the spectral count data was sufficient for reliable quantitation of proteins from which TUBEs enrichment was estimated. However, a quantitation by ion counts using survey scans was necessary for a reliable quantitation of GG and LRGG modified REX1 peptides. Quantitation by ion counts relies on robust alignment of survey scans across the 160 LC-MS, but retention time dimensions showed great variability across all runs, as expected (Figure 3.S2). The alignment of runs turned out to be complicated by the large differences in detected ions from TUBEs runs compared to GST control runs. One possible solution to this problem would be to perform the quantitation using a delta retention time interval of plus/minus 4 min, but quantitation based on Extracted Ion Chromatogram (XIC) with such large retention time intervals will sum intensities from unrelated ions from other peptides even when high mass accuracy is used. We therefore performed the quantitation of GG and LRGG modified peptides from REX1 by using mass, charge and isotope dependent XIC (mziXIC) values [38] and [39], which can be estimated by VEMS. Therefore, the database search was subsequently repeated using VEMS [40] and [41] with the same search settings as for Mascot except four missed cleavages were used instead of two. The search results from Mascot and VEMS were in great part similar however some peptide assignments by Mascot with diglycine tag on a C-terminal lysine were not observed in the VEMS search result. The VEMS search result allowed the extraction of mziXIC values [38] and [39] using 0.005 Da as mass accuracy and a delta retention time interval of plus/minus 4 min. The extracted mziXIC values were manually validated through all 160 LC-MS runs.

2.11. Analysis of ubiquitylation sites

To gain insight into the ubiquitylated proteins isolated by the TUBEs, proteins with a single peptide passing the FDR < 5% threshold and containing the characteristic gly-gly or leu-arg-gly-gly tags were also considered as potentially ubiquitylated. However, taking into account that the identification of these

proteins may rely only on a modified peptide, all these peptides were manually inspected. The reliable hits are included as supplementary data.

2.12. Functional analysis

The average log ratio of spectral counts from TUBEs enriched versus GST (log (Ub/GST)) enriched proteins for each of the stages in *P. falciparum* infection were plotted in a heatmap using the R package heatmap.2. Gene ontology enrichment analysis was performed using online bioinformatics tool DAVID <http://david.abcc.ncifcrf.gov/> [42] and *P* values corrected for multiple testing by Benjamini-Hochberg method were used for all subsequent GO analysis. Quantitative spectral count data were extracted for proteins in gene ontology categories that were found to be enriched by using the above mentioned criteria. The average log ratio of spectral counts from TUBEs enriched versus GST enriched “log(Ub/GST)” for each of the different stages were plotted in boxplots using the R statistical programming language. Kruskal-Wallis rank sum test were applied to test for significant regulation of TUBEs associated proteins belonging to specific functional categories. A two-side Mann-Whitney *U* test was applied to determine the significant differences between individual groups. Venn diagrams of TUBEs enriched proteins from different stages were created using the R package Venn. Protein enrichment analysis with the bioinformatics tool DAVID was performed on all the groups created in the Venn diagrams of *H. sapiens* and *P. falciparum* TUBEs enriched proteins. In order to compare our results with the results obtained by Ponts and collaborators [19], GST exclusive proteins were subtracted from the respective datasets. No subtraction was performed with the Ponts dataset, since no control-exclusive bound protein was used. The remaining Mata-GST dataset was compared to the whole Ponts dataset, and also to the set of proteins considered as “enriched” under Ponts criteria. All the Ponts “enriched” proteins were present in the Mata-GST dataset.

2.13. IPA analysis

Analysis using Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) integrated canonical signaling pathways associated to all *H. sapiens* or *P. falciparum* proteins (p -value < 0.05 calculated by Fishers's exact test). Human homologues of *P. falciparum* proteins were identified using the NCBI's protein BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) restricted to Swissprot database and *H. sapiens*. These homologues of *P. falciparum* proteins were used for functional analysis in IPA. The calculated p -values determine the probability that the association between proteins in the dataset and the canonical pathways is explained by chance alone.

3. RESULTS

3.1. Enrichment of TUBEs-associated ubiquitin proteome from *P. falciparum* iRBC at different IDC stages

In order to identify the TUBEs-associated ubiquitin proteome of *P. falciparum* and *H. sapiens* along the IDC (Figure 3.1A and Figure 3.S1), a complete protocol was set up to enrich TUBEs interacting proteins from uRBCs and *P. falciparum* iRBCs followed by one dimensional gel electrophoresis, in-gel trypsin digestion and LC-MS/MS (Figure 3.1B) [27],[28] and [36]. Briefly, synchronized *P. falciparum* cultures with high parasitaemia levels were obtained by combining sorbitol-percoll treatments, magnetic column purification and reduction in the haematocrit to increase the invasion rates, following exactly the same conditions previously published [36]. Ubiquitylation pattern of proteins was determined by synchronization of *P. falciparum* in the different phases of the parasite IDC. High parasitaemia levels up to 40% were critical to enrich for infected erythrocytes proteins over uninfected erythrocytes proteins and for parasite protein content. Keeping parasitaemias higher than 10% in normal cultures is technically cumbersome as the parasite regulates the population density and high parasitaemias eventually induce parasite stress. The healthy state of the parasites in the conditions applied in this study was previously demonstrated. The parasites

were able to grow, incorporating hypoxanthine, as a normal culture [36] and to invade new RBCs in a new invasion cycle. Thus, uRBCs or iRBC cultures were harvested after 18 h (rings), 32 h (trophozoites) and 42 h (schizonts) of reinvasion (Figure 3.1A and B). Figure 3.S1 shows the giemsa smears performed to monitor the parasitaemia and to check the parasite life cycle evolution. A population enrichment of more than 90% was obtained in the indicated stage as well as the high parasitaemia.

Each culture was lysed in an equal volume of lysis buffer and added to TUBEs or GST cross-linked columns. Crosslinked beads reduced the presence of TUBEs that can interfere with MS analysis when applying strong elution conditions. Capture of TUBEs interacting proteins, which consists mainly of ubiquitylated proteins as well as ubiquitin-interacting factors, was possible due to the non-denaturing conditions used during the whole procedure. Binding of unspecific proteins were reduced by thorough washing [27]. Two biological replicas were performed using the same conditions to assess reproducibility (see Section 2 and [27]). The SYPRO Ruby stained gel revealed proteins which were captured by the GST control beads (Figure 3.1C). However, the signal coming from the ubiquitylated proteins was almost absent from the GST samples (Figure 3.1D). The SYPRO Ruby stained gel revealed that TUBEs interacting proteins were considerably more abundant compared to GST (Figure 3.1C). Pooled eluted fractions from TUBEs contained low levels of ubiquitylated proteins in uninfected red blood cells (uRBC) but increased along the *P. falciparum* IDC (Figure 3.1D). The highest levels of ubiquitylated proteins were present in iRBC at schizonts stage, which coincides with the previously reported peak of ubiquitylated proteins of *P. falciparum* [19]. For the MS analysis, samples were processed as previously reported [26], [27] and [28].

3.2. Analysis of ubiquitylation signatures

The identification of peptides was carried out by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) after tryptic digestion of proteins localized in discrete bands and isolated from polyacrylamide gels stained with SYPRO Ruby (Figure 3.1B and C). Mascot and VEMS searches were

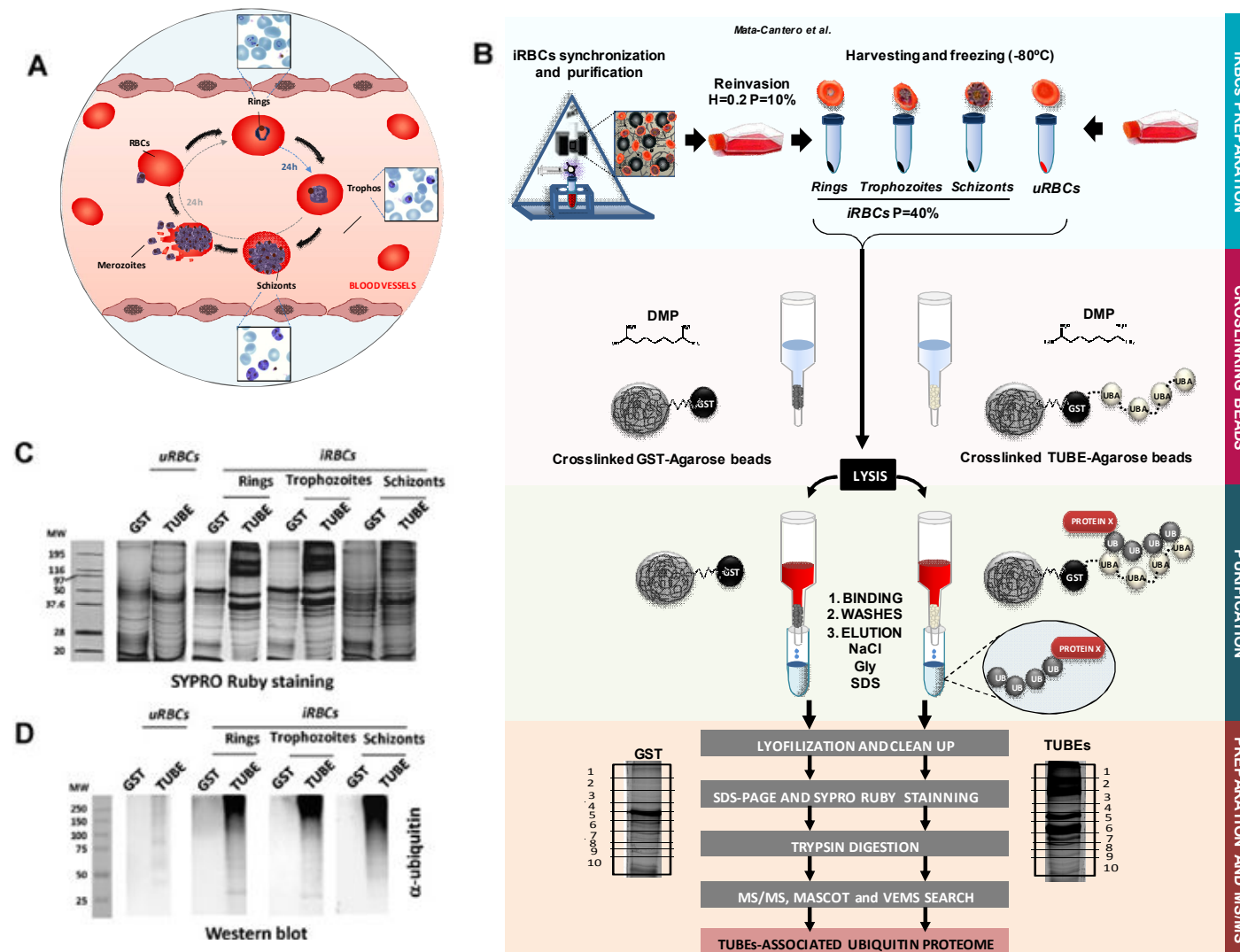


Figure 3. 1. Identification of ubiquitylated proteins using TUBEs-LC-MS/MS method. **A)** Intraerythrocytic Developmental Cycle of *P. falciparum*. **B)** Synchronized *P. falciparum* iRBC at 40% parasitaemia from rings, trophozoites and schizonts stages were collected and frozen. TUBE enriched proteins from iRBC at different stages and uRBC were captured using TUBEs or GST (control) previously crosslinked with DMP to agarose beads. After exhaustive washes, proteins captured were eluted, cleaned by precipitation and resolved by electrophoresis (PAGE). Bands with proteins were analyzed by LC-MS/MS. Data processing, database searching, integration and quantitative analysis were performed as indicated in the methods section. **C)** SYPRO ruby staining of proteins captured with TUBEs or GST crosslinked agarose beads. **D)** Analysis by Western-blot with an anti-ubiquitin antibody of proteins obtained from different cultures and captured with TUBEs or GST crosslinked agarose beads.

conducted considering the presence of GG (+ 114.0429 Da) or LRGG (+ 383.2281 Da) on lysine residues.

The complementary VEMS search was performed to allow automated and semi-automated label free quantitation based on ion counts in survey scans (see Section 2.10 for further details). The above mass signatures on lysine residues are indicative of peptides that have been modified with ubiquitin. Proteins identified with a single peptide with a false discovery rate (FDR) of < 5% were considered, and a manual inspection of all the selected putative ubiquitylated peptides was performed in order to discard false positives (e.g. some peptides with GG located on the C-terminal lysine from the Mascot search were manually discarded).

The results of these filtered searches are summarized on Table 3.1. A total of 23 ubiquitylated peptides assigned to 12 proteins were found. The results revealed abundant presence of ubiquitylated peptides originating from the ubiquitin itself across all infection stages (Proteins 6–7 in Table 3.1 and Figure 3.2). Four polyubiquitin-C sites were found: K6 (Table 3.1, 7.4–7.5), K11 (Table 3.1, 7.7–7.8), K48 (Table 3.1, 7.1–7.3) and K63 (Table 3.1, 7.6, Figure 3.2A and B). The sites K11 and K48 were clearly the most abundant sites and these are known to mediate proteasome degradation [43]. Limited evidence was obtained for the detection of K63, which was found only at trophozoites stage (Figure 3.2B). Notably, evidence for the presence of a specific K11 peptide from *P. falciparum* ubiquitin was obtained at both trophozoites and schizonts stages (Table 3.1). Ubiquitylated peptides were also detected in our GST control, but in a significant lesser extent than in TUBE samples (Figure 3.2B). Figure 3.2C shows the spectral counts for peptides representing K48 over gel slices: slice 1 (high molecular mass) to 10 (low molecular mass). The highest abundance was found in high molecular mass region of the gel and a lower peak at gel slice 6 was evident. The manual inspection of the spectra revealed the presence of reliable GG modified-peptides in all infection stages including peptides from proteins involved in metabolism, stress response, protein transport, translation and functional regulation of nucleic acids (Table 3.1).

Table 3. 1. Ubiquitylated signatures found in *P. falciparum* iRBCs and uRBCs. Ubiquitylated peptides containing the GG signature were identified in both *H. sapiens* and *P. falciparum* proteins. These peptides were enriched in uRBC (U), rings (R), trophozoites (T) and schizonts (S) stages.

Ref	Sequence	Modifications	Entry UniprotKB	Protein	Organism	U	R	T	S
1	NQKESEKDLR	K7(GlyGly)	GPTC1_HUMAN	G patch domain-containing protein 1	<i>H. sapiens</i>				
2	MNKSIFK	M1(Oxidation), K3(GlyGly)	Q8I3W6_PLAF7	Helicase, belonging to UvrD family, putative	<i>P. falciparum</i>				
3.1	FFESFGDLSTPDVAMGNPKVK	M15(Oxidation), K19(GlyGly)	HBB_HUMAN/HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit beta/delta	<i>H. sapiens</i>				
3.2	VVAGVANALAHKYH	K12(GlyGly)	HBB_HUMAN/HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit beta/delta	<i>H. sapiens</i>				
4	MARTKQTAR	K5(GlyGly)	H3_HUMAN/C6KSV0_HUMAN	Histone H3.1, Histone H3.2, Histone H3.3 (human)/Histone H3 (<i>Plasmodium</i>)	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
5	LKEEHKETIK	K7(GlyGly)	C0H477_PLAF7	Inorganic pyrophosphatase, putative	<i>P. falciparum</i>				
6	TLTGKTITLDVEPSDTIENVK	K5(GlyGly)	Q7KQK2_PLAF7	Polyubiquitin	<i>P. falciparum</i>				
7.1	LIFAGKQLEDGR	K6(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.2	LIFAGKQLEDGR	K6(LeuArgGlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.3	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	K6(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.4	MQIFVKTLTGK	K6(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.5	MQIFVKTLTGK	M1(Oxidation), K6(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.6	TLSDYNIQKESLHLVLR	K9(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.7	TLTGKTITLEVEPSDTIENVK	K5(GlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
7.8	TLTGKTITLEVEPSDTIENVK	K5(LeuArgGlyGly)	UBC_HUMAN/PLAF7	Polyubiquitin-C	<i>H. sapiens/P. falciparum</i>				
8	GADKELLPK	K4(GlyGly)	DTD2_HUMAN	Probable D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 2	<i>H. sapiens</i>				
9	KKFHSILYN	K1(GlyGly), K2(GlyGly)	C0H4A1_PLAF7	Putative uncharacterized protein	<i>P. falciparum</i>				
10.1	EKDEEQQILK	K10(LeuArgGlyGly)	Q8I2G1_PLAF7	Ring-exported protein	<i>P. falciparum</i>				
10.2	TKDEYLQLK	K2(GlyGly)	Q8I2G1_PLAF8	Ring-exported protein	<i>P. falciparum</i>				
10.3	TKDEYLQLKDLQK	K9(GlyGly)	Q8I2G1_PLAF7	Ring-exported protein	<i>P. falciparum</i>				
10.4	TQGDVDPVAVQKVLNK	K11(GlyGly)	Q8I2G1_PLAF9	Ring-exported protein	<i>P. falciparum</i>				
11	AVEKVEK	K4(GlyGly)	SSDH_HUMAN	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	<i>H. sapiens</i>				
12	KGESQTDIEITR	K1(GlyGly)	TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma	<i>H. sapiens</i>				

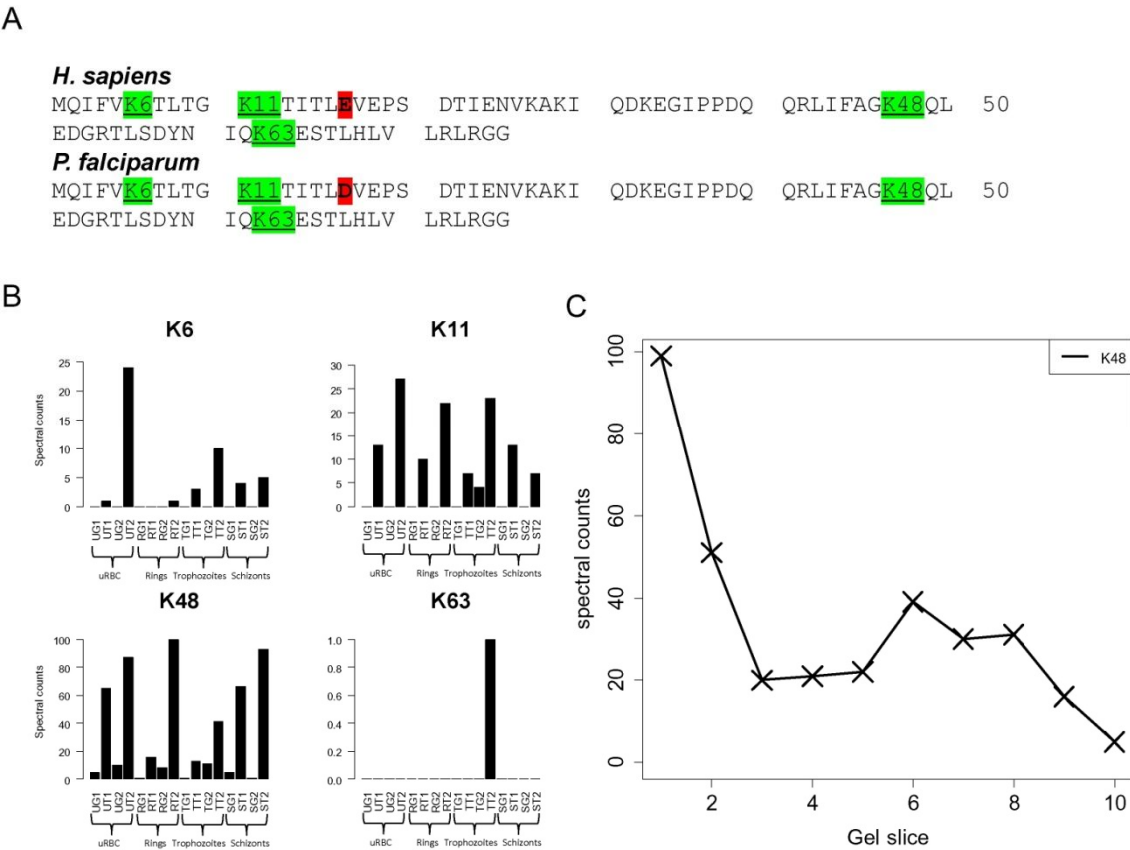


Figure 3. 2. Ubiquitin chains found in uRBC and iRBC. A) Comparison of the *H. sapiens* and *P. falciparum* ubiquitin proteins with the single amino acid difference highlighted in red. Ubiquitylated lysines identified by MS are highlighted in green. **B)** Spectral counts of ubiquitin peptides containing the ubiquitin GG signature identified in both *H. sapiens* and *P. falciparum* proteins along the IDC. The four letters in the sample names indicates: U — uRBC, R — rings, T — trophozoites, S — schizonts, G — GST and T — TUBEs. **C)** Spectral counts for peptides representative of K48 ubiquitin modification over gel slices from high molecular mass (1) to low molecular mass (10).

3.3. REX1 reaches a maximum level of ubiquitylation in trophozoites stage

The Ring exported protein 1 from *P. falciparum* (REX1 Q8I2G1_PLAF7/PF3D7_0935900, Table 3.1, 10.1–10.4) was one of the most prominently ubiquitylated proteins found by MS/MS (Table 3.1 and Figure 3.3). Our spectral count-based quantification and enrichment analysis revealed that this protein was enriched in both trophozoites and schizonts stages (please see Figure 3.5, Section 3.5, entry PF3D7_0935900). However, assignment of MS/MS spectra to ubiquitylated peptides from REX1 was only obtained at trophozoites stage (Table 3.1, 10.1–10.4).

These peptides provided evidence for four REX1 ubiquitylated lysine residues at positions 261, 279, 308 and 315 (Figure 3.3A, B). To further confirm the results obtained and to investigate if REX1 ubiquitylation could occur in other stages, *P. falciparum* extracts from different stages of IDC were analyzed by Western-blot using a specific REX1 antibody [32]. Our results indicate that high molecular weight forms of REX1 were concentrated at trophozoites stage but also observed at schizonts and rings stage at lower levels (Figure 3.3C). Quantitation based on ion counts in survey scans of all 160 LC-MS runs was conducted and all values were manually validated to confirm the peak of REX1 ubiquitylation in trophozoites stage (Figures 3.3D and 3.S2). Quantitative values above zero for the peaks representing the four ubiquitylated peptides from REX1 were exclusively obtained in LC-MS runs based on peptide samples extracted from the upper gel bands. Figure 3.3D summarizes the quantitative ion count values obtained for the four REX1 ubiquitin peptides extracted from gel slices corresponding to the highest molecular weight (gel slices 1).

REX1 controls the formation and architecture of Maurer's clefts, which are *P. falciparum* derived membranous structures that form an important component of its export secretory system [33]. Figure 3.3E represents the transport system that involves Maurer's clefts organelles with some of the associated proteins which were identified in this study (shaded proteins and Supplementary Table 3.S2) [44].

3.4. TUBEs-associated ubiquitin proteome from *P. falciparum* iRBC

To select a reliable dataset of TUBEs enriched proteins, a stringent protein identification filter was established and only proteins with at least two peptides with FDR < 5% were considered for further analysis (see Section 2). Taking into account all the stages, a total of 1237 proteins (683 proteins from *H. sapiens* and 554 from *P. falciparum*) meeting these criteria were selected (Supplementary Table 3.S1). Among the 683 *H. sapiens* proteins and 554 *P. falciparum* proteins identified, 194 from *H. sapiens* and 166 from *P. falciparum* were exclusively bound

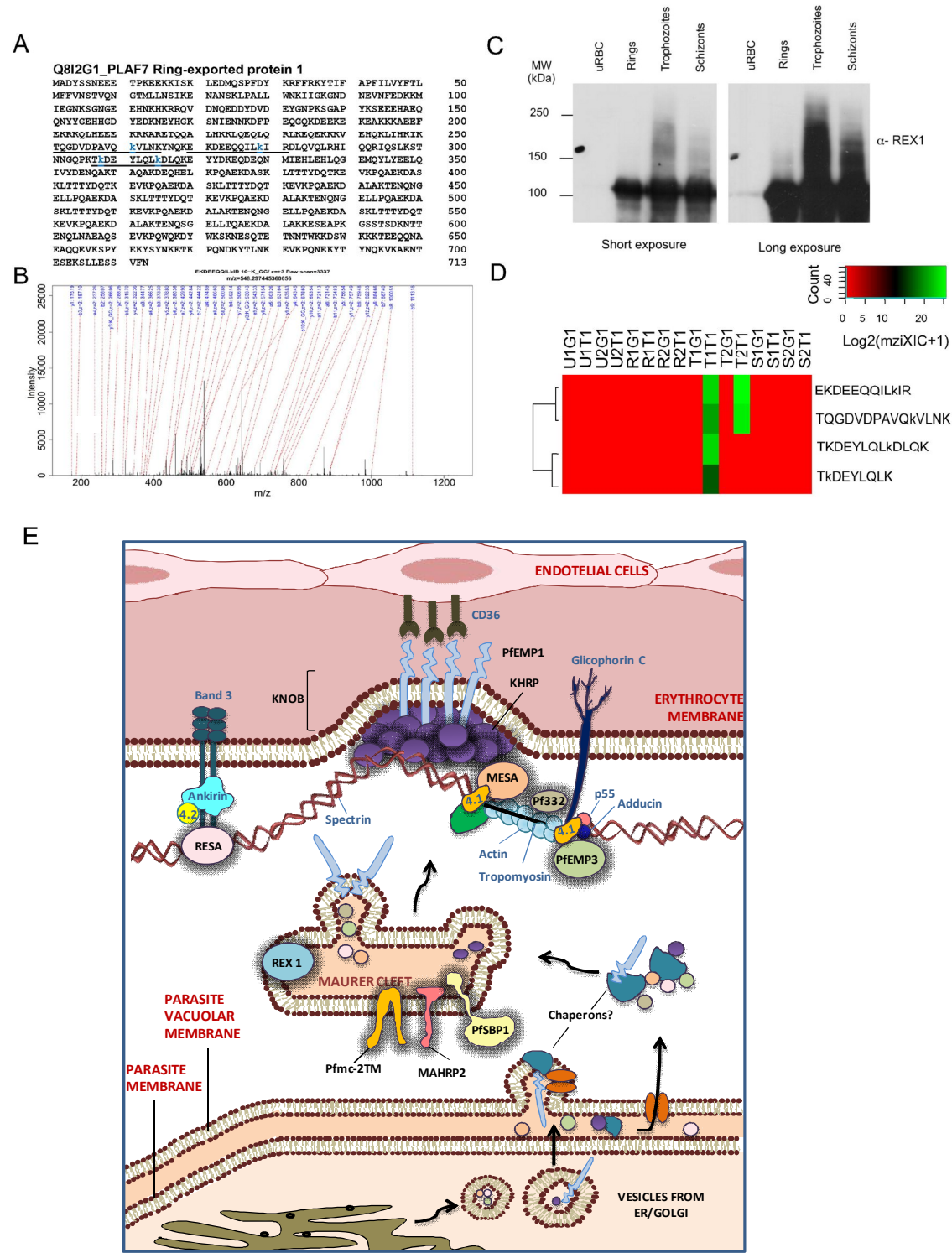


Figure 3. Ubiquitylation of the Ring exported protein 1 in association with components of the Maurer's clefts organelles. **A)** Identified ubiquitin sites in REX1 highlighted in lower case blue and the corresponding peptide identified by MS/MS underlined. **B)** Annotated raw spectra of the ubiquitylated peptide EKDEEQQILKIR. **C)** Western-blot detection of the REX1 protein in different stages of the IDC of *P. falciparum* using isolated *P. falciparum* extracts and REX1 antibody. **D)** Summary of ion counts for the four ubiquitylated REX1 peptides from the gel slices corresponding to the highest molecular bands. The four letters in the sample names indicates: 1) U — uRBC, R

— rings, T — trophozoites and S — schizonts, 2) replica number, 3) G — GST and T — TUBEs, 4) gel slice number. **E)** Representation of the Maurer's cleft system. *H. sapiens* proteins in blue and *P. falciparum* proteins in black. Shaded proteins were identified by MS/MS analysis. REX1, PfSBP1, Pf332 and RESA were TUBEs enriched while PfEMP3, PfMC-2TM, KAHRP, MARHP2 and MESA were identified by MS/MS but not enriched by TUBEs.

to TUBEs (Figure 3.S3), indicating unspecific binding of proteins that should be removed from the analysis. For this reason, only proteins showing at least 1.5 spectral count fold difference between TUBE and GST control in both biological replicates in at least one stage (uRBCs, rings, trophozoites or schizonts iRBCs) were referred as enriched proteins and further analyzed. Even though this criterion of selection resulted in the elimination of some proteasomal subunits and proteins known to be ubiquitylated (Supplementary Table 3.S1), the selected proteins have higher chances to effectively be part of the host or parasite ubiquitin proteome. Thus, a total of 196 proteins (Figure 3.4A) were considered as enriched, of which 90 were from *H. sapiens* (Figure 3.4B) and 106 from *P. falciparum* (see Figure 3.4C, Supplementary Table 3.S1).

Interestingly, while the number of *H. sapiens* enriched proteins slightly decreased during the different infection stages (Figure 3.4B), *P. falciparum* proteins increased progressively peaking at the schizonts stage (Figure 3.4C and Supplementary Table 3.S1). To confirm the overall regulation observed in the Venn diagram, iRBC proteins were separated into host parasite fractions, and total ubiquitylated proteins from *H. sapiens* and *P. falciparum* were analyzed by Western-blot (Figure 3.4D). Since there is only a single amino acid difference (E > D at residue 16) between *H. sapiens* and *P. falciparum* ubiquitin (Figure 3.2A), the same *H. sapiens* antibody was used to detect both homologous proteins (Figure 3.4D). Western-blot results indicated that while *H. sapiens* ubiquitylated proteins decrease, *P. falciparum* increase along RBC infection, confirming the trend observed by MS/MS analysis (comparison of Figure 3.4ABC with Figure 3.4D). A gene ontology (GO) analysis of the enriched proteins was carried out in order to further characterize the biological and molecular events in which these proteins are involved. GO and KEGG analysis of TUBEs enriched proteins was computed using the online resource DAVID [42] (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). *H.*

sapiens and *P. falciparum* enriched proteins found in *P. falciparum* iRBCs were analyzed for GO protein categories in biological process (BP), cellular components (CC), and molecular function (MF) (Table 3.S3, Table 3.S4, Table 3.S5, Table 3.S6, Table 3.S7 and Table 3.S8 and Figure 3.4, Figure 3.5 and Figure 3.6).

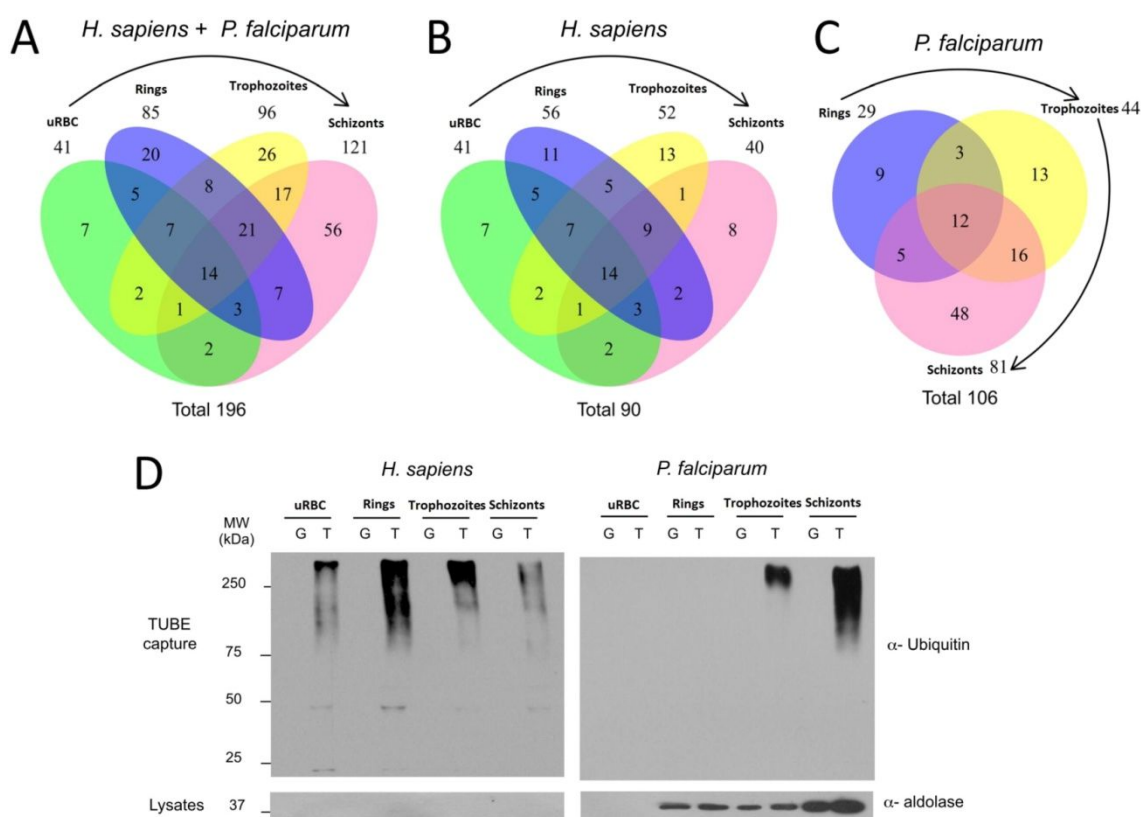


Figure 3. 4. Venn diagrams of TUBEs enriched proteins identified by MS/MS analysis. Stage exclusive and overlapping proteins are indicated. A) Total TUBEs enriched proteins from *H. sapiens* and *P. falciparum*. B) *H. sapiens* enriched proteins. C) *P. falciparum* enriched proteins. D) Analysis of total ubiquitylated proteins from different stages of iRBC or uRBC. Ubiquitylated proteins were extracted using TUBEs from *H. sapiens* and *P. falciparum* fractions and analyzed by Western-blot with anti-ubiquitin antibody. The parasite specific enzyme aldolase was used to control contamination of *H. sapiens* fraction

Average $\log(\text{Ub}/\text{GST})$ ratios were subsequently displayed in heatmaps to obtain a general view of the simultaneous host and parasite ubiquitin-regulated processes occurring in each infection stage. To achieve this, the average log ratio of spectral counts from TUBEs versus GST control, “ $\log(\text{Ub}/\text{GST})$ ”, of TUBEs enriched proteins from *H. sapiens* and *P. falciparum* (Supplementary Table 3.S1) were

plotted in two heatmaps (see Figure 3.5A and 3.5B). Red color indicates low enrichment while green color indicates high enrichment. Heatmaps show a highly dynamic ubiquitin proteome along the IDC, especially in the parasite. The distributions of average log ratios (Ub/GST) for proteins belonging to significantly functional enriched GO categories were plotted in boxplots. We further tested the null hypothesis that the average log ratios (Ub/GST) along the intraerythrocytic cycle for each of these functional categories are from identical populations by applying Kruskal-Wallis rank sum test. The result revealed that the average log ratios (Ub/GST) along the intraerythrocytic cycle for four out of six significant functional enriched GO categories are from non identical populations ($P < 0.05$). This suggests that the TUBEs-associated ubiquitin proteome belonging to these four functional categories are both functionally enriched and also significantly regulated over the intraerythrocytic cycle (Figure 3.5). Furthermore, a two-side Mann-Whitney U test (indicated as stars in Figure 3.5) revealed significant regulation between groups in the intraerythrocytic cycle for the four GO categories that was found significantly regulated according to the Kruskal-Wallis rank sum test. uRBCs and iRBCs proteins were significantly enriched in the GO category “protein folding factors” and these *H. sapiens* proteins were significantly regulated, according to the Kruskal-Wallis test, during the different infection stages (see the boxplot of log ratios in Figure 3.5A). *H. sapiens* proteins from the gene ontology categories “threonine type peptidases” and “components of the *H. sapiens* UPS” decreased along the distinct stages of *P. falciparum* infection (Figure 3.5A). In contrast, *P. falciparum* endopeptidases and components of the UPS importantly increase along the different stages of infection together with DNA replication initiation factors that peak at schizont stage (Figure 3.5B). In this stage, TUBEs enriched *P. falciparum* factors increased up to 70% coinciding with the progression of the parasite cycle (Figures 3.4C, 3.5B and Supplementary Table 3.S1). This crosstalk behavior that occurs between *P. falciparum* and *H. sapiens* proteases suggests that the parasite could lead to a down regulation of proteolytic functions of the host, thereby inhibiting the host proteasome system to survive the non-favorable host environment and being able to complete its IDC.

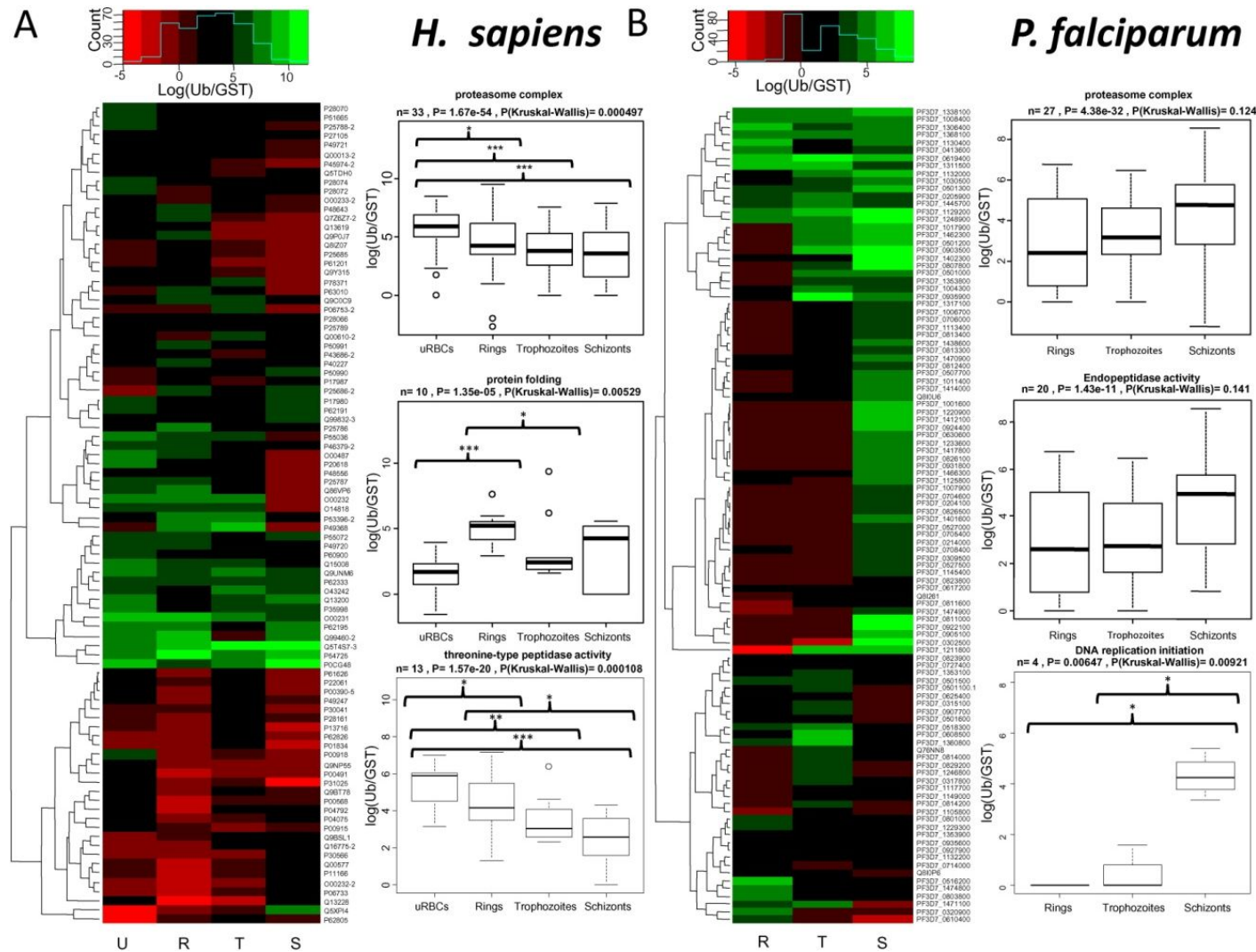


Figure 3. 5. Heatmap of average log(Ub/GST) ratios from *H. sapiens* and *P. falciparum* TUBE enriched proteins. **A)** Left panel: Heatmap of average log(Ub/GST) ratios for *H. sapiens* proteins in uRBC, rings, trophozoites and schizonts iRBCs. Right panel: boxplot showing the distribution of log(Ub/GST) ratios for human proteins significantly enriched in different gene ontology categories: proteasome complex, protein folding and threonine type peptidase activity. **B)** Similar analysis as in A for *P. falciparum* proteins. Gene ontology categories included in the right panel: proteasome complex, endopeptidase activity and DNA replication initiation. Letters below heatmaps indicate: U — uRBC, R — rings, T — trophozoites and S — schizonts. Stars indicate results of Mann-Whitney *U* test: ***) p value < 0.001, **) $0.001 \leq p$ value < 0.01, and *) $0.01 \leq p$ value < 0.05.

3.5. Regulation of TUBEs enriched *P. falciparum* proteins with no human homologues

The analysis of the *H. sapiens* homologues of the enriched *P. falciparum* proteins revealed 20 proteins with no correspondence with human counterparts (Supplementary Table 3.S1 and Section 3.4 chapter 2). Many of them are involved in the Maurer's Cleft parasite secretory pathway such as for example REX1 discussed in Section 3.3 (Figure 3.3E). Interestingly, some TUBEs enriched proteins found in this study, such as *Pf*SBP1 (PF3D7_1248900), antigen 332 (PF3D7_1017900), and RESA (PF3D7_0102200) are associated with Maurer's cleft organelles [3], [45], [46], [47] and [48], highlighting the role of ubiquitin in the regulation of this secretory system.

In addition, proteins non-enriched by TUBEs associated with the export function such as MARHP2, KAHRP, MESA, *Pf*MC-2TM and EMP3 were also found in the MS/MS analysis (Figure 3.3E and Supplementary Table 3.S2). In addition to components of the Maurer's cleft, other TUBEs enriched proteins with no *H. sapiens* homologues were identified. Among these, some have no known function or are membrane proteins involved in invasion and adhesion processes [47] and [48], and for this reason should be considered as potential candidates for vaccine development. This is the case of the cytoadherence linked asexual protein 3.1 (O77310_PLAF7), RAP2 (Q8I484_PLAF7) and RAP3 (Q8I485_PLAF7). Other non-enriched proteins found such as Rhoptry-associated proteins RAP1 (Q8ILZ1_PLAF7), RhopH3 (Q8I395_PLAF7), PIESP2 erythrocyte surface protein (Q8I488_PLAF7), surface protein *Pf*113 (Q8ILP3_PLAF7), erythrocyte membrane-associated antigen (Q8IC35_PLAF7), circumsporozoite-related antigen (Q8IIF0_PLAF7), erythrocyte binding antigen-140 (Q76NM5_PLAF7) and merozoites proteins (Q8I0U8_PLAF7, Q8IJD0_PLAF7, Q8IDX8_PLAF7) could also have a potential for vaccine development.

3.6. Regulation of UPS components

Our results clearly show that components of the UPS were identified among the enriched proteins. We therefore performed a detailed analysis of these results

for both *H. sapiens* and *P. falciparum*. To identify the differential and most relevant *H. sapiens* and *P. falciparum* components of the UPS along the IDC, log(Ub/GST) values for TUBEs enriched proteins were calculated and displayed in Figure 3.6. In this representation enriched proteins are depicted by green color and each square indicates the enrichment ratio for a specific stage (from left to right: uRBCs, ring iRBCs, trophozoites iRBCs and schizont iRBCs). In the case of the proteasome components (as defined by *Aminake et al.* [13]), the top squares correspond to *H. sapiens* proteins and the bottom squares represent *P. falciparum* proteins. Altogether, our results are in agreement with the host and parasite UPS crosstalk described in our previous analyses (Figure 3.4 and Figure 3.5). *H. sapiens* E3 ligases HUWE1 (Q7Z6Z7-2) and KCMF1 (Q9P0J7) were enriched at early stages of infection while UBR4 (Q5T4S7-3) and RNF123 (Q5XPI4) appeared after the infection and were more enriched at late stages of the IDC. In contrast *P. falciparum* E3 ligases TRIP12 (PF3D7_0704600), UPL1 (PF3D7_0826100), UBE4B (PF3D7_0826500), RNF115 (PF3D7_1004300), AARP1 (PF3D7_1233600) and Cullin1 (PF3D7_0811000) were all enriched at late stages particularly in schizonts. The *H. sapiens* USP5 (P45974-2) and *P. falciparum* Mov34 (PF3D7_1368100) deubiquitylating enzymes appeared to be more enriched at ring and trophozoites stages. As a general observation, 19S subunits were more enriched than 20S proteasomal subunits (Figure 3.6A and Supplementary Table 3.S1) most likely due to their capacity to interact with ubiquitylated proteins. While *H. sapiens* 20S subunits decreased along the infection, many 20S *P. falciparum* subunits were more enriched at late stages, in particular the $\beta 6$ (PF3D7_0931800) and the catalytic subunits $\beta 1$ (PF3D7_0518300), $\beta 2$ (PF14_0676), and $\beta 5$ (PF3D7_1011400) (Figure 3.6A and Supplementary Table 3.S1). Most *H. sapiens* proteasome 19S subunits were also enriched at early stages of infection and showed the lowest levels when *P. falciparum* 19S subunits were enriched (Figure 3.6A). This is the case for RPN5 (PF3D7_1017900), RPN6 (PF3D7_1402300), RPN7 (PF3D7_1129200), RPN9 (PF3D7_1030500), RPN11 (PF3D7_1368100), RPN2 (PF3D7_1466300), RPN10 (PF3D7_0807800), RPN13 (PF3D7_1414000), RPT3 (PF3D7_0413600) and RPT6 (PFL2345c). To further characterize factors associated with the *P. falciparum* UPS, the ubiquitylation of

heat shock proteins (HSPs) involved in the folding and/or aggregation of proteasome-targeted proteins was analyzed by Western-blot using purified *P. falciparum* extracts. High molecular weight forms of *Pf*HSP40/DNAJ (PF3D7_0501100) and *Pf*HSP90 (PF3D7_0708400) that might correspond to ubiquitylation were found enriched at schizont stage (Figure 3.6B).

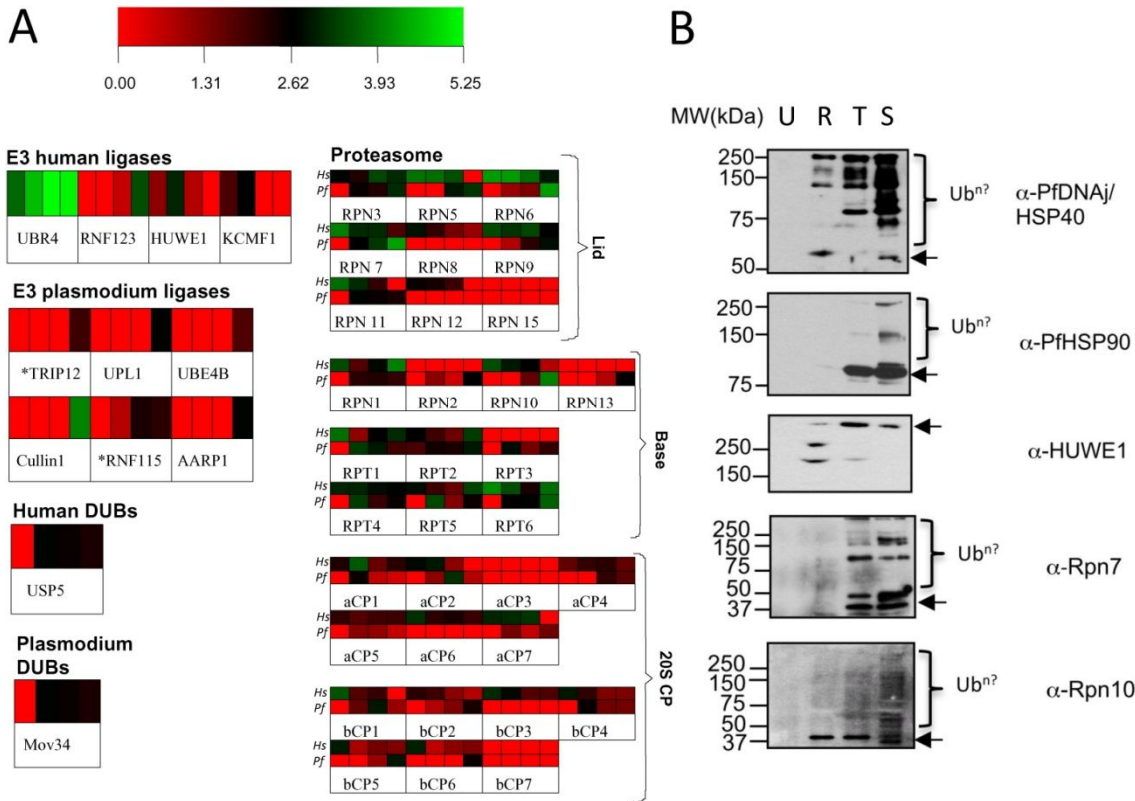


Figure 3. 6. Enrichment of components of the ubiquitin proteasome system in *P. falciparum* iRBCs. **A)** Average log(Ub/GST) ratios of *H. sapiens* and *P. falciparum* UPS TUBEs enriched proteins from uRBC, rings, trophozoites and schizonts iRBCs (each square correspond to each stage respectively). Color gradient from red to green indicates log(Ub/GST) enrichment level. Only enriched proteins have been included. Separate illustrations are provided for E3 ligases and DUBs from *H. sapiens* and *P. falciparum* as there were no direct ortholog correspondences for all proteins identified. Enrichment of proteasome subunits are represented both for the *H. sapiens* (four top squares) and *P. falciparum* (four bottom squares) orthologs. The accession numbers for human E3 ligases are: ("Q5T4S7-3", "Q5XPI4", "Q7Z6Z7-2", "Q9P0J7"). *H. sapiens* DUB: "P45974-2". *P. falciparum* E3 ligases: ("PF3D7_0704600", "PF3D7_0826100", "PF3D7_0826500", "PF3D7_0811000", "PF3D7_1004300", "PF3D7_1233600"). *P. falciparum* DUB: "PF3D7_1368100". **B)** Western-blot detection of *P. falciparum* UPS components during IDC using isolated *P. falciparum* extracts. Heat shock proteins *Pf*HSP40 and *Pf*HSP90 were detected with specific *P. falciparum* antibodies. The *P. falciparum* ubiquitin-protein ligase 1 UPL1 (PF3D7_0826100) and proteasomal subunits RPN7 and RPN10 were detected with an *H. sapiens* antibody against HUWE1 and RPN proteins respectively. U: uRBCs, R: rings, T: trophozoites, and S: schizonts (iRBCs).

Given the high similarity between many *Plasmodium* proteins and their human counterparts, human antibodies were used for detection of some *P. falciparum* proteins from purified extracts. In this way, the *P. falciparum* Ubiquitin-protein ligase 1 (UPL1, PF3D7_0826100) which is the homologue of human HUWE1, the proteasome subunits RPN7 (PF11_0303) and RPN10 (PF08_0109) were detected (Figure 3.6B). High molecular weight forms of these proteasome subunits suggest their ubiquitylation and overexpression at late stages of infection, supporting our previous observations (Figure 3.6B).

3.7. Functional regulation of TUBEs enriched proteins during IDC

To further investigate the most important pathways and regulated processes, a functional annotation of TUBEs enriched proteins was assigned using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (<http://www.ingenuity.com/>). This software quickly detects relationships between identified proteins, functions or pathways of relevance, taking into account published data. *H. sapiens* homologues of *P. falciparum* proteins were identified using BLAST searching (Supplementary Table 3.S1). The *H. sapiens* and *H. sapiens* homologues of *P. falciparum* enriched proteins were analyzed in IPA. In agreement with the results above (Figure 3.5 and Figure 3.6), protein ubiquitylation canonical pathway showed the highest-log(P) values for both *H. sapiens* (Supplementary Figure 3.S7A) and *P. falciparum* (Supplementary Figure 3.S7B) enriched proteins. Interestingly, the analysis of the components of a simplified version of the UPS canonical pathway revealed differences between organisms upon infection (Supplementary Figure 3.S8). *H. sapiens* HSPs and DUBs were exclusively enriched in iRBCs, suggesting a relevant role upon infection (Supplementary Figure 3.S8B) while Ubiquitin-E4 factors were an exclusive feature for *P. falciparum* (Supplementary Figure 3.S8C).

IPA analysis also pointed out the involvement of *H. sapiens* TUBEs enriched proteins in the NRF2 pathway at trophozoite stage (Supplementary Figure 3.S7 and Supplementary Table 3.S1). This pathway upregulates the expression of proteasome catalytic subunits [49] and contributes to endoplasmic reticulum (ER) stress response by enhancing proteasome-mediated ERAD [50]. Furthermore, analysis of upstream regulators revealed the enrichment of a subset of *H.*

sapiens factors belonging to the chaperonin containing TCP1 complex (CCT): complex consisting of (DNAJB1 P25685, HSPB1 P04792, CCT3 P49368, CCT4 P50991, CCT6 P40227, CCT7 Q99832, CCT8 P50990 and TCP1 P17987) also known as TCP1 ring complex (TriC), which is associated with oxidative stress response (Supplementary Table 3.S1). Importantly, ubiquitylated peptides of CCT3 (T-complex protein 1 subunit gamma) were identified with our approach (Table 3.1), revealing a direct ubiquitin-mediated regulation of these proteins. Finally, proteins related with clathrin mediated endocytosis signalling (Supplementary Figures 3.S7, 3.S9 and Supplementary Table 3.S1) appeared to be regulated by ubiquitylation at trophozoite stage where an intense vesicular transport activity occurs within the RBC [51] and [52].

In agreement with the results obtained in the GO analysis (Figure 3.5B), the analysis of canonical pathways in *P. falciparum* indicated that DNA replication factors were some of the most remarkable *P. falciparum* enriched proteins at schizont stage (Figure 3.5 and Supplementary Figure 3.S7B). Mini-chromosome maintenance (MCM) proteins MCM2 (PF3D7_1417800), MCM3 (PF3D7_0527000), MCM4 (PF3D7_1317100), MCM7 (PF3D7_0705400), were among the proteins enriched by TUBEs (Figure 3.5B, enriched in green). In addition, other non-enriched proteins belonging to the MCM complex such as MCM5 (PF3D7_1211700) and MCM6 (PF3D7_1355100) as well as PCNA2 [53], DNA topoisomerase II [54], and RFA [55] were also identified in the MS/MS analysis (Figure 3.7A and Supplementary Table 3.S1), revealing a high induction of the parasite DNA replication machinery for this phase. Based on their connectivity, IPA integrates enriched MCM proteins into the “cell cycle control of chromosomal replication” functional network (Figure 3.7B). Red color highlighted proteins indicates the enhanced presence of these proteins in the analysis performed. This network includes several *P. falciparum* homologues of ubiquitin enzymes such as UPL1 (PF3D7_0826100 HUWE1), confirmed by Western-blot (Figure 3.6B), UBE4A (PF08_0020), UBR3 (PF3D7_1233600) and ubiquitin-receptors like Ubiquilin 1 (PF11_0142) and 4 (PF3D7_1132000) (Figure 3.7B and Supplementary Table 3.S1) supporting the existence of an intense crosstalk between ubiquitylation and replication during cell cycle progression.

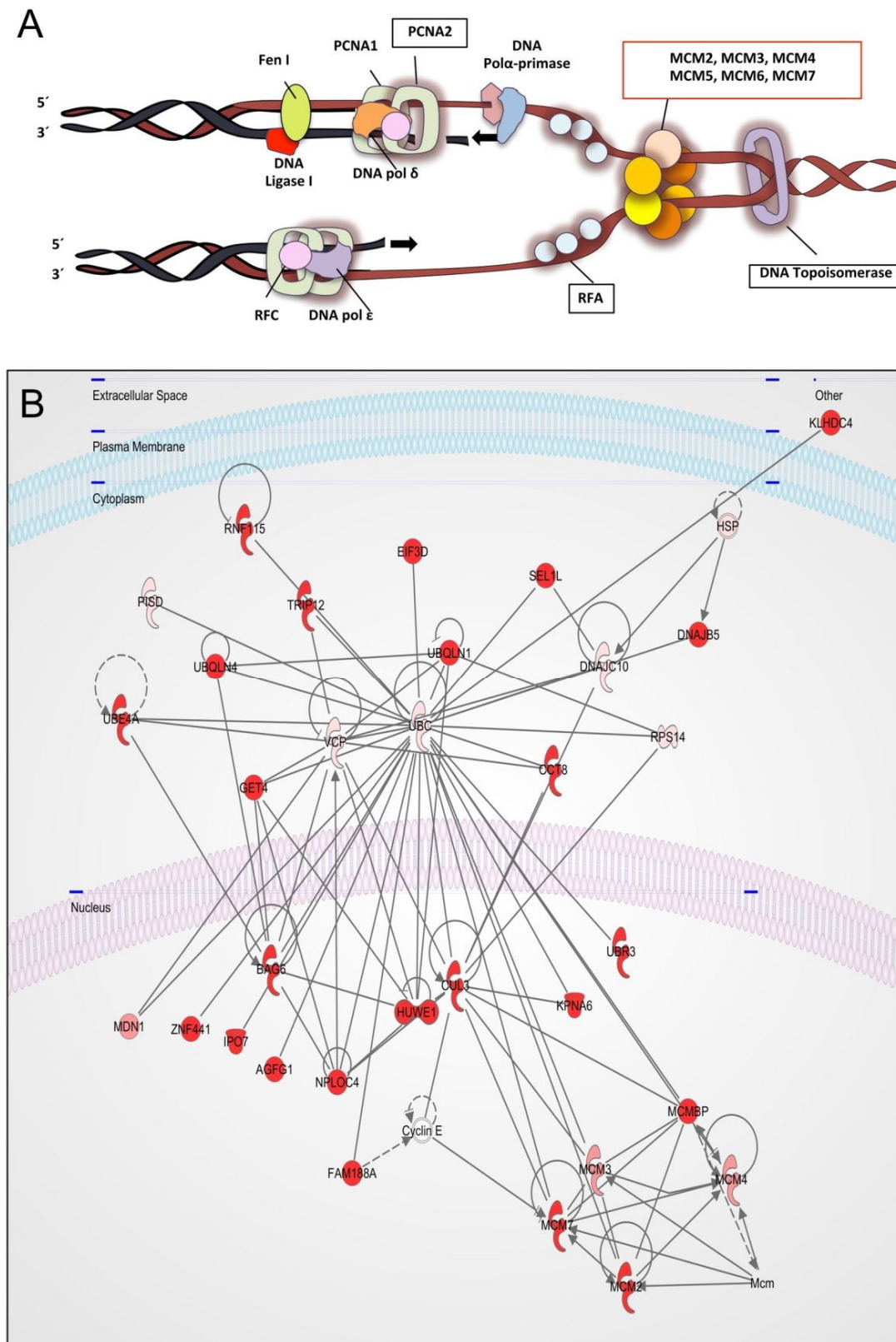


Figure 3.7. *P. falciparum* DNA replication factors regulated by ubiquitylation. A) Representation of the DNA replication fork. Proteins identified in the MS/MS analysis are shaded and framed. Minichromosome maintenance proteins were found enriched as well as other DNA replication factors. **B)** MCM proteins integrated by Ingenuity in the

functional network of cell cycle control of chromosomal replication. This network connects enriched (red) ubiquitin enzymes, protein substrates and receptors with less (orange) and low (pink) abundant proteins. Unidentified proteins have no color. KLHDC4 (PF3D7_1125800), HSP (Heat Shock Protein 1 and 2 not found in this study), DNAJB5 (PF3D7_0102200), DNAJc10 (PF3D7_0823800), SEL1L (PF3D7_0204100), RPS14 (PF3D7_0516200), EIF3D (PF3D7_1007900), RNF115 (PF3D7_1004300), TRIP12 (PF3D7_0704600), UBQLN1 (PF3D7_1113400), CCT8 (PF3D7_0214000), UBC (Ubiquitin PF3D7_1211800), TRIP12 (PF3D7_0704600), PISD (PF3D7_0927900), VCP (PF3D7_0619400), UBE4A (F3D7_0826500), GET4 (PF3D7_1438600), UBR3 (PF3D7_1233600), KPNA6 (PF3D7_0812400), CUL3 (PF3D7_0811000), HUWE1 (UPL1 PF3D7_0826100), BAG6 (PF3D7_0922100), MDN1 (PF3D7_0813300), ZNF441 (PF3D7_0501200), IPO7 (PF3D7_0706000), AGFG1 (PF3D7_0905100), NPLOC4 (PF3D7_0507700), FAM188A (PF3D7_0630600), MCMBP (PF3D7_1412100), MCM3 (PF3D7_0705400), MCM4 (PF3D7_1317100), MCM7 (PF3D7_0705400), MCM2 (PF3D7_0705400).

Other proteins in this network are chaperones such as CCT8 and DNAJB5, a Hsp40 homologue. In summary, these results underline the role of ubiquitin in the regulation of the parasite's MCM helicase complex, including the formation of the replication fork and therefore in the initiation and elongation phases of DNA replication [56], [57] and [58].

4. DISCUSSION

The ubiquitin proteome of the IDC of *P. falciparum* constitutes an essential source of information for future studies in this organism, including response to drugs, environmental perturbations and genetic alterations. In our global analysis of the *P. falciparum* ubiquitin proteome, we selected a list of enriched proteins among the proteins specifically interacting with TUBEs with the aim of identifying factors heavily regulated by ubiquitylation and their interactors (Supplementary Table 3.S1). Changes in the ubiquitin proteome from *P. falciparum* and its human counterpart have been observed despite of the presence of 60% of uRBCs in the sample and minor overlap between stages. Previous studies identified part of the ubiquitin-proteome from *P. falciparum*, but the fraction corresponding to the host was not characterized [19]. The total number of proteins identified by Ponts and collaborators was 437 representing 26% less than those identified in our analysis

(554). 290 of the proteins identified in our study (around 66%) overlap with the proteins identified by Ponts and collaborators. Although this overlap is important, a significant fraction of the ubiquitin proteome from *P. falciparum* identified in each of the approaches is different (Figure 3.S10 and Supplementary Table 3.S9). These differences can be explained by the distinct methodologies used in both studies (antibodies vs ubiquitin-traps), the filters used to retain enriched proteins and also by the fact that in our study the ubiquitin-proteome of *P. falciparum* was isolated from the whole iRBC, including proteins that are exported to the RBCs, among others. From the 106 enriched proteins of this study, 39 of them were not detected by Ponts and collaborators and 55 proteins were not considered as enriched under Ponts analysis criteria, reducing the enriched protein overlapping to 12. A low overlap is also observed when enriched proteins from both studies are analyzed by stages of IDC (Figure 3.S10 and Supplementary Table 3.S9). In conclusion, although an important number of proteins identified by Ponts and collaborators were confirmed in our study validating our data, large discrepancies exist depending on the type of controls and filters used. Further studies should consider the full data set in addition to the filtered information.

Enzymes and UPS cofactors were the most significantly enriched canonical pathways identified using different bioinformatics approaches. According to IPA, UPS-linked proteins represented around 34% and 50% of the *P. falciparum* and *H. sapiens* TUBEs enriched proteins, respectively (Figure 3.4 and Figure 3.5 and Supplementary Table 3.S1). The analysis performed revealed a crosstalk between the UPS of both organisms, suggesting that the parasite infection leads to a down regulation of the proteolytic functions of its host to better survive in the host environment (Figure 3.4 and Figure 3.5 and Supplementary Table 3.S1). *H. sapiens* 20S and 19S subunits were more present at early stages of the infection while *P. falciparum* proteasome subunits increase at late stages. The multiple subunits of the 26S proteasome could have been captured directly by TUBEs because of their ubiquitylation or because they were interacting with ubiquitylated proteins [59], [60] and [61]. In support of the first hypothesis, we identified proteasomal subunits that are known to be ubiquitylated, such as RPN10 [60] and [61] or RPN13 [59]. Western-blot analysis showed that PfRPN10

(PF3D7_0807800) and *PfRPN7* (PF3D7_1129200) presented slowly migrating forms that could correspond to ubiquitin modified forms (Figure 3.6B). On the other hand, proteasomal subunits containing ubiquitin-binding domains (UBDs) could have been captured through their interaction with ubiquitylated proteins, supporting the second hypothesis. This is the case for RPN10 (P55036 and PF3D7_0807800) and RPN13 (Q16186 and PF3D7_1414000) from both *H. sapiens* and *P. falciparum*.

The drastic reduction on the host protein ubiquitylation levels could be explained by a combination of events including increased levels of DUBs as it was observed with the *H. sapiens* USP5 (P45974-2), which suggests an active deubiquitylation of unanchored polyubiquitin chains [62] during the *P. falciparum* infection. Furthermore, general cellular events such as the drastic amino acid reduction and energy depletion that occur during *P. falciparum* IDC could also contribute to decrease this ATP dependent process [63] and [64]. Despite the reduction of total ubiquitylation level of the host along the IDC, some *H. sapiens* ligases such as UBR4 increase along the infection (Figure 3.6A and Supplementary Table 3.S1). In the case of *P. falciparum* proteins, there is a consistent correlation between the increase in the overall ubiquitylation during the infective cycle, and the enrichment of E3 ligases (TRIP12, UPL1, UBE4B, Cullin 1, RNF115, AARP1) (Figure 3.5 and Supplementary Figure 3.S7), and a decrease of the DUB member of the JAB1/MPN +/MOV34 (JAMM) domain metalloproteases [65] at schizonts stage. Altogether these data provide evidences that some enzymes of the ubiquitylation/deubiquitylation machinery are important for the regulation of critical steps of the *P. falciparum* infection. However, further studies are required to evaluate their potential as candidates for the development of specific inhibitors.

Our results revealed a strong regulation of the parasite's DNA replication machinery and a correlation with the UPS activity in the later stages of the infection. A group of *P. falciparum* MCM's were enriched by TUBEs at schizont stage, suggesting their putative ubiquitylation. In addition, other non-enriched components of the DNA replication machinery were identified in our dataset, revealing the presence of these complexes in the sample. The integration of

ubiquitin ligases that interact with DNA replication factors, such as UPL1 (HUWE in *H. sapiens*) or cullin 3, acquires biological significance in the context of the *P. falciparum* infection (Figure 3.6B). The role of cullin3 in the attachment of K48 ubiquitin chains into MCM protein subunits is known to be required to complete replication [66] (Figure 3.6A and B). Thus, our results support an important role of the UPS in this essential process [58] underlining its potential as target to disrupt the life cycle of this parasite.

An interesting enrichment of *P. falciparum* proteins involved in the formation of Maurer's Clefts was seen in our system. Maurer's clefts are *P. falciparum*-derived membranous structures necessary for protein export and parasite survival. Their activity leads to the formation of Knobs for the cytoadhesion of the infected cell to the endothelium of blood vessels, avoiding their removal by the spleen. In this regard, the ubiquitylation of REX1 was one of the main outcomes of this study, since it plays a main role in the formation and architecture of Maurer's clefts [3], [44], [45], [46], [47] and [48]. In addition to REX1, some other proteins associated with Maurer's cleft organelles were found in this analysis, highlighting the role of ubiquitin in the regulation of this secretory system along the IDC (Figure 3.7B and Supplementary Table 3.S2). Moreover its low homology with any human counterpart (Supplementary Table 3.S1) underlines this system as a possible target for drug development. The activity of chaperones is of paramount importance for the proper development and function of Maurer's clefts, since several chaperones are involved in this protein secretion process, bringing the proteins to a final destination [67]. In this regard, members of the *P. falciparum* HSP70 and HSP40 families are exported and their interaction with components of the Maurer's clefts system has been established [68], [69] and [70]. The ubiquitylation of *P. falciparum* HSP40 has been confirmed in this study (Figure 3.6B) suggesting a link between the activity of the UPS and processes required for the development and survival of the parasite. In addition to its function on Maurer's cleft development, HSP40 family has been associated with invasion, chaperone-mediated translocation, assembly and regulation of *P. falciparum* and human erythrocyte remodelling [71], [72] and [73]. Additional proteins have been pinpointed in this work, such as *Pf*HSP90 that plays an essential role in parasite

growth and regulation of signal transduction pathways [73] or CCTs that have been associated with the delivery of bacterial toxins into the cytosol of the host [74]. Proteins with no human counterpart and unknown function, such as Cytoadherence linked asexual protein 3.1 (O77310_PLAF7), RAP 2 (Q8I484_PLAF7) and RAP3 (Q8I485_PLAF7) were also identified.

5. CONCLUSION

Altogether, these findings indicate that the UPS is utilized throughout the *P. falciparum* IDC and that some fractions of this system play specific roles along the cycle. Numerous proteins have been found in this analysis that are clearly regulated by the UPS and could play a role during *P. falciparum* infection. Among them enzymes of the UPS, DNA replication factors, chaperones or individual exported parasite proteins, controlling changes in RBC membrane properties and virulence could be considered as putative targets for future therapeutic approaches. With malaria continuing to be a major worldwide disease, advances towards understanding the basic biology of *P. falciparum* remain essential. The proteome-wide ubiquitome will be useful not only for the further annotation of many uncharacterized ubiquitin-regulated proteins, but also for defining the molecular and cellular processes regulating this highly specialized parasitic organism. Such studies are a major objective in the search for the development of novel antimalarial drugs.

ABBREVIATIONS

CCT: chaperonin containing TCP1 complex

DMP: dimethyl pimelidate

DUB: deubiquitinase

DUBs: deubiquitylating enzymes

GO: gene ontology

GSH: glutathione acceptor beads

GST: glutathione-S-transferase

H. sapiens: *Homo sapiens*

HSPs: heat shock proteins

IDC: intraerythrocytic developmental system

IPA: ingenuity pathway analysis

IRBCs: infected red blood cells

MCM: mini-chromosome maintenance proteins

MS: mass spectrometry

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

REX1: Ring-exported protein

TUBEs: Tandem Ubiquitin Binding Entities

UBA: ubiquitin-associated domains

UPL1: ubiquitin-protein ligase 1

UPLC-MS/MS: ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

UPS: ubiquitin proteasome system

URBCs: uninfected red blood cells

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Imanol Peña for his contribution in the conception and design of this project to Alfonso Mendoza, Ruben Gonzalez and Laura Sanz for helpful discussions, to Iraide Escobes for the essential work carried out during sample preparation for MS, and Lorea Zabaleta for her technical support. We are very grateful to Doctors S. Wing, D Gardiner and K Trenholme for the HUWE1 and REX1 antibodies provided.

REFERENCES

- [1] WHO Expert Committee on Malaria, World Health Organization Technical Report, Series 892 (1–74)
- [2] A.F. Cowman, B.S. Crabb, Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124 (2006), pp. 755–766
- [3] A.G. Maier, B.M. Cooke, A.F. Cowman, L. Tilley. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7 (2009), pp. 341–354

- [4] D.W. Chung, N. Ponts, S. Cervantes, K.G. Le Roch. Post-translational modifications in *Plasmodium*: more than you think!. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 168 (2009), pp. 123–134
- [5] M.J. Hamilton, M. Lee, K.G. Le Roch. The ubiquitin system: an essential component to unlocking the secrets of malaria parasite biology. *Mol. Biosyst.*, 10 (2014), pp. 715–723
- [6] E.L. Ponder, M. Bogyo. Ubiquitin-like modifiers and their deconjugating enzymes in medically important parasitic protozoa. *Eukaryot. Cell*, 6 (2007), pp. 1943–1952
- [7] N. Ponts, J. Yang, D.W. Chung, J. Prudhomme, T. Girke, P. Horrocks, *et al.* Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS One*, 3 (2008), p. e2386
- [8] T. Spallek, S. Robatzek, V. Gohre. How microbes utilize host ubiquitination. *Cell. Microbiol.*, 11 (2009), pp. 1425–1434
- [9] S. Spork, J.A. Hiss, K. Mandel, M. Sommer, T.W. Kooij, T. Chu, *et al.* An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot. Cell*, 8 (2009), pp. 1134–1145
- [10] R. Hjerpe, M.S. Rodriguez. Alternative UPS drug targets upstream the 26S proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40 (2008), pp. 1126–1140
- [11] W. Xolalpa, P. Perez-Galan, M.S. Rodriguez, G. Roue. Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Curr. Pharm. Des.*, 19 (2013), pp. 4053–4093
- [12] Mata-Cantero, F. Aillet, V. Lang, M.S. Rodriguez. The ubiquitin proteasome system (UPS) as a cancer drug target: emerging mechanisms and therapeutics. G.T. Wondrak (Ed.), *Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*, Springer Science Books, New York (2014), pp. 223–263
- [13] M.N. Aminake, H.D. Arndt, G. Pradel. The proteasome of malaria parasites: a multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention?. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, 2 (2012), pp. 1–10
- [14] M.J. Edelmann, B.M. Kessler. Ubiquitin and ubiquitin-like specific proteases targeted by infectious pathogens: emerging patterns and molecular principles. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008 (1782), pp. 809–816
- [15] C. Lindenthal, N. Weich, Y.S. Chia, V. Heussler, M.Q. Klinkert. The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology*, 131 (2005), pp. 37–44
- [16] J. Prudhomme, E. McDaniel, N. Ponts, S. Bertani, W. Fenical, P. Jensen, *et al.* Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. *PLoS One*, 3 (2008), p. e2335
- [17] J.M. Reynolds, K. El Bissati, J. Brandenburg, A. Gunzl, C.B. Mamoun. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor Bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin. Pharmacol.*, 7 (2007), p. 13
- [18] K. Artavanis-Tsakonas, S. Misaghi, C.A. Comeaux, A. Catic, E. Spooner, M.T. Duraisingh, *et al.* Identification by functional proteomics of a deubiquitinating/deNeddylating enzyme in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.*, 61 (2006), pp. 1187–1195
- [19] N. Ponts, A. Saraf, D.W. Chung, A. Harris, J. Prudhomme, M.P. Washburn, *et al.* Unraveling the ubiquitome of the human malaria parasite. *J. Biol. Chem.*, 286 (2011), pp. 40320–40330
- [20] S.J. Field, J.C. Pinder, B. Clough, A.R. Dlugewski, R.J. Wilson, W.B. Gratzer. Actin in the merozoite of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 25 (1993), pp. 43–48
- [21] M.B. Trelle, A.M. Salcedo-Amaya, A.M. Cohen, H.G. Stunnenberg, O.N. Jensen. Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Proteome Res.*, 8 (2009), pp. 3439–3450

- [22] D.W. Chung, N. Ponts, J. Prudhomme, E.M. Rodrigues, K.G. Le Roch. Characterization of the ubiquitylating components of the human malaria parasite's protein degradation pathway. *PLoS One*, 7 (2012), p. e43477
- [23] R. Hjerpe, M.S. Rodriguez. Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 36 (2008), pp. 823–827
- [24] W. Kim, E.J. Bennett, E.L. Huttlin, A. Guo, J. Li, A. Possemato, *et al.* Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell*, 44 (2011), pp. 325–340
- [25] R. Hjerpe, F. Aillet, F. Lopitz-Otsoa, V. Lang, P. England, M.S. Rodriguez. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep.*, 10 (2009), pp. 1250–1258
- [26] F. Lopitz-Otsoa, E. Rodriguez-Suarez, F. Aillet, J. Casado-Vela, V. Lang, R. Matthiesen, *et al.* Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). *J. Proteome*, 75 (2012), pp. 2998–3014
- [27] W. Xolalpa, L. Mata-Cantero, F. Aillet, M.S. Rodriguez. Isolation of the ubiquitin-proteome from tumour cell lines and primary cells using TUBEs. R. Matthiesen (Ed.), *PROTEOSTASIS reviews and protocols*, Springer Science Books (2016) (in press)
- [28] M. Azkargorta, I. Escobes, F. Elortza, R. Matthiesen, M.S. Rodriguez. TUBEs-mass spectrometry for identification and analysis of the ubiquitin-proteome. R. Matthiesen (Ed.), *PROTEOSTASIS Reviews and Protocols*, Springer Science Books (2016) (in press)
- [29] Y. Shi, D.W. Chan, S.Y. Jung, A. Malovannaya, Y. Wang, J. Qin. A data set of human endogenous protein ubiquitination sites. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* (2011) (10:M110 002089)
- [30] Y. Yoshida, Y. Saeki, A. Murakami, J. Kawawaki, H. Tsuchiya, H. Yoshihara, *et al.* A comprehensive method for detecting ubiquitinated substrates using TR-TUBE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112 (2015), pp. 4630–4635
- [31] Z. Liu, D. Miao, Q. Xia, L. Hermo, S.S. Wing. Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. *Dev. Dyn.*, 236 (2007), pp. 2889–2898
- [32] M.W. Dixon, P.L. Hawthorne, T. Spielmann, K.L. Anderson, K.R. Trenholme, D.L. Gardiner. Targeting of the ring exported protein 1 to the Maurer's clefts is mediated by a two-phase process. *Traffic*, 9 (2008), pp. 1316–1326
- [33] E. Hanssen, P. Hawthorne, M.W. Dixon, K.R. Trenholme, P.J. McMillan, T. Spielmann, *et al.* Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer's cleft organelles. *Mol. Microbiol.*, 69 (2008), pp. 938–953
- [34] W. Trager, J.B. Jensen. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193 (1976), pp. 673–675
- [35] A. Radfar, D. Mendez, C. Moneriz, M. Linares, P. Marin-Garcia, A. Puyet, *et al.* Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nat. Protoc.*, 4 (2009), pp. 1899–1915
- [36] L. Mata-Cantero, M.J. Lafuente, L. Sanz, M.S. Rodriguez. Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. *Malar. J.*, 13 (2014), p. 112
- [37] Stefan Baumeister, Markus Winterberg, K. Lingelbach. Fractionation of the iRBC. Kirsten Moll, Inger Ljungström, Hedvig Perlmann, Artur Scherf, M. Wahlgren (Eds.), *Methods in Malaria Research* (fifth ed.), Malaria Research and Reference Reagent Resource Center and American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA (2008), pp. 79–81
- [38] R. Matthiesen. LC-MS spectra processing. *Methods Mol. Biol.*, 1007 (2013), pp. 47–63
- [39] R. Matthiesen, J. Bunkenborg. Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol. Biol.*, 1007 (2013), pp. 1–45

- [40] A.S. Carvalho, H. Ribeiro, P. Voabil, D. Penque, O.N. Jensen, H. Molina, *et al.* Global mass spectrometry and transcriptomics array based drug profiling provides novel insight into glucosamine induced endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Proteomics*, 13 (2014), pp. 3294–3307
- [41] R. Matthiesen. Algorithms for database-dependent search of MS/MS data. *Methods Mol. Biol.*, 1007 (2013), pp. 119–138
- [42] W. Huang da, B.T. Sherman, R.A. Lempicki. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, 4 (2009), pp. 44–57
- [43] A.M. Weissman, N. Shabek, A. Ciechanover. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12 (2011), pp. 605–620
- [44] H. Wickert, G. Krohne. The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends Parasitol.*, 23 (2007), pp. 502–509
- [45] S.K. Prajapati, R. Culleton, O.P. Singh. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red cells and impact of the expansion of exported protein families. *Parasitology*, 1-11 (2014)
- [46] B. Elsworth, B.S. Crabb, P.R. Gilson. Protein export in malaria parasites: an update. *Cell. Microbiol.*, 16 (2014), pp. 355–363
- [47] J.M. Bautista, P. Marin-Garcia, A. Diez, I.G. Azcarate, A. Puyet. Malaria proteomics: insights into the parasite-host interactions in the pathogenic space. *J. Proteome*, 97 (2014), pp. 107–125
- [48] J.A. Boddey, A.F. Cowman. *Plasmodium* nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu. Rev. Microbiol.*, 67 (2013), pp. 243–269
- [49] A. Arlt, I. Bauer, C. Schafmayer, J. Tepel, S.S. Muerkoster, M. Brosch, *et al.* Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 28 (2009), pp. 3983–3996
- [50] S. Lee, E.G. Hur, I.G. Ryoo, K.A. Jung, J. Kwak, M.K. Kwak. Involvement of the Nrf2-proteasome pathway in the endoplasmic reticulum stress response in pancreatic beta-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 264 (2012), pp. 431–438
- [51] C. Godlee, M. Kaksonen. Review series: from uncertain beginnings: initiation mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.*, 203 (2013), pp. 717–725
- [52] M.S. Pieperhoff, M. Schmitt, D.J. Ferguson, M. Meissner. The role of clathrin in post-Golgi trafficking in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 8 (2013), p. e77620
- [53] C. Xue, K. Liang, Z. Liu, R. Wen, W. Xiao. Similarities and differences between Arabidopsis PCNA1 and PCNA2 in complementing the yeast DNA damage tolerance defect. *DNA Repair*, 28 (2015), pp. 28–36
- [54] M.E. Ashour, R. Atteya, S.F. El-Khamisy. Topoisomerase-mediated chromosomal break repair: an emerging player in many games. *Nat. Rev. Cancer*, 15 (2015), pp. 137–151
- [55] M.S. Wold. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 66 (1997), pp. 61–92
- [56] I.H. Cheng, L.A. Roberts, B.K. Tye. Mcm3 is polyubiquitinated during mitosis before establishment of the pre-replication complex. *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), pp. 41706–41714
- [57] M. Das, S. Singh, S. Pradhan, G. Narayan. MCM paradox: abundance of eukaryotic replicative helicases and genomic integrity. *Mol. Biol. Int.*, 2014 (2014), p. 574850
- [58] B.C. O'Connell, J.W. Harper. Ubiquitin proteasome system (UPS): what can chromatin do for you?. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19 (2007), pp. 206–214
- [59] H.C. Besche, Z. Sha, N.V. Kukushkin, A. Peth, E.M. Hock, W. Kim, *et al.* Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates. *EMBO J.*, 33 (2014), pp. 1159–1176

- [60] Z. Lipinszki, L. Kovacs, P. Deak, A. Udvardy. Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors. *Biochemistry*, 51 (2012), pp. 2461–2470
- [61] M. Isasa, E.J. Katz, W. Kim, V. Yugo, S. Gonzalez, D.S. Kirkpatrick, *et al.* Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Mol. Cell*, 38 (2010), pp. 733–745
- [62] S. Dayal, A. Sparks, J. Jacob, N. Allende-Vega, D.P. Lane, M.K. Saville. Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J. Biol. Chem.*, 284 (2009), pp. 5030–5041
- [63] Z. Ye, K. Van Dyke, R.N. Rossan. Effective treatment with a tetrandrine/chloroquine combination for chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Aotus monkeys. *Malar. J.*, 12 (2013), p. 117
- [64] K.L. Olszewski, M.W. Mather, J.M. Morrissey, B.A. Garcia, A.B. Vaidya, J.D. Rabinowitz, *et al.* Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 466 (2010), pp. 774–778
- [65] Z.M. Eletr, K.D. Wilkinson. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014 (1843), pp. 114–128
- [66] R. Bailey, S. Priego Moreno, A. Gambus. Termination of DNA replication forks: “Breaking up is hard to do”. *Nucleus*, 6 (2015), pp. 187–196
- [67] M. Lanzer, H. Wickert, G. Krohne, L. Vincensini, Breton C. Braun. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.*, 36 (2006), pp. 23–36
- [68] T.J. Sargeant, M. Marti, E. Caler, J.M. Carlton, K. Simpson, T.P. Speed, *et al.* Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol.*, 7 (2006), p. R12
- [69] N.L. Hiller, S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estrano, *et al.* A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, 306 (2004), pp. 1934–1937
- [70] M. Marti, R.T. Good, M. Rug, E. Knuepfer, A.F. Cowman. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306 (2004), pp. 1930–1933
- [71] E.R. Pesce, I.L. Cockburn, J.L. Goble, L.L. Stephens, G.L. Blatch. Malaria heat shock proteins: drug targets that chaperone other drug targets. *Infect. Disord. Drug Targets*, 10 (2010), pp. 147–157
- [72] M. Botha, E.R. Pesce, G.L. Blatch. The Hsp40 proteins of *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa: regulating chaperone power in the parasite and the host. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39 (2007), pp. 1781–1803
- [73] G. Banumathy, V. Singh, S.R. Pavithra, U. Tatu. Heat shock protein 90 function is essential for *Plasmodium falciparum* growth in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 278 (2003), pp. 18336–18345
- [74] L.H. Slater, E.C. Hett, A.E. Clatworthy, K.G. Mark, D.T. Hung. CCT chaperonin complex is required for efficient delivery of anthrax toxin into the cytosol of host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013), pp. 9932–9937

SUPPLEMENTARY TABLES

Table 3.S1: All proteins identified across all samples.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc1.xlsx/276834/html/S1874391916300598/5e3b7d84a4c0395a0c3f5f67702b6fd9/mmc1.xlsx>

Table 3.S2: Proteins summarized by *Boddey et al.* [46] and *Maier et al.* [3] as exported proteins and found in this study.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc2.docx/276834/html/S1874391916300598/843421dd5996f43defadb84950708d7d/mmc2.docx>

Table 3.S3: Result from functional enrichment using gene ontology "biological process" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4B (*H. Sapiens*). The tables were manually downloaded from DAVID bioinformatics server. "-" minus indicates that the subsequent identifications were subtracted. E.g. "uRBC Rings Trophozoites - Schizont" means all enriched protein identifications from uRBC, rings, trophozoites minus those from schizont.

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc3.xlsx/276834/html/S1874391916300598/ad2d07b9176bf0ca5281bee32304733c/mmc3.xlsx>

Table 3.S4: Result from functional enrichment using gene ontology "biological process" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4C (*P. falciparum*).

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc4.xlsx/276834/html/S1874391916300598/570416ce54cf02403c114d8117e1ff4a/mmc4.xlsx>

Table 3.S5: Result from functional enrichment using gene ontology "cellular component" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4B (*H. Sapiens*).

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc5.xlsx/276834/html/S1874391916300598/e4af4149aeb4dc140e5476bac5e29c5d/mmc5.xlsx>

Table 3.S6: Result from functional enrichment using gene ontology "cellular component" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4C (*P. falciparum*).

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc6.xlsx/276834/html/S1874391916300598/daa9b0f8ea7b6768ed44d57b25727005/mmc6.xlsx>

Table 3.S7: Result from functional enrichment using gene ontology "molecular function" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4B (*H. Sapiens*).

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc7.xlsx/276834/html/S1874391916300598/156acdf477692298345c03e083af9290/mmc7.xlsx>

Table 3.S8: Result from functional enrichment using gene ontology "molecular function" for all groups defined by Venn diagram in Figure 3.4C (*P. falciparum*).

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc8.xlsx/276834/html/S1874391916300598/3198ea25a9cf3cc314e6686d9c16a012/mmc8.xlsx>

Table 3.S9: Comparison of identifications *Mata-Cantero et al.* versus *Ponts et al.*

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1874391916300598/1-s2.0-S1874391916300598-mmc9.xlsx/276834/html/S1874391916300598/7226d378508866ddc52ff31207ab20a1/mmc9.xlsx>

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure 3.S1. Giemsa stain of iRBCs corresponding to 18 (rings), 32 (trophozoites) and 42 hours (schizonts) after invasion to illustrate the intraerythrocytic life cycle evolution. More than 90% of the parasite population states in the indicated stage. Samples were obtained following exactly the same protocol previously described in *Mata-Cantero et al 2014* to enrich parasite stages and iRBCs at 40% parasitaemia.

Figure 3.S2. Examples of ion counts extracted from survey scans for the peptide EKDEEQILKIR 10-K_GG, z=3. AC) A delta retention time of plus/minus 4 min was considered for both replicate 1 and 2. "R" indicates replica number. BD) Zoom in on the peaks used for quantification which were identified in the considered regions in AC).

Figure 3.S3. Venn diagrams for MS identified proteins with TUBE versus GST. A) *H. sapiens* B) *P. falciparum*.

Figure 3.S4. Gene ontology enrichment analysis of biological processes for *H. sapiens* and *P. falciparum*.

Figure 3.S5. Gene ontology enrichment analysis of cellular component for *H. sapiens* and *P. falciparum*.

Figure 3.S6. Gene ontology enrichment analysis of molecular function for *H. sapiens* and *P. falciparum*.

Figure 3.S7. Functional enrichment analysis for (A) *H. sapiens* and (B) *P. falciparum* performed by Ingenuity.

Figure 3.S8. The UPS implication during *P. falciparum* infection of RBC. Ubiquitylated proteins captured by TUBEs from *H. sapiens* and *P. falciparum* cell extracts were analyzed by Ingenuity. UPS canonical pathway shows in red the components identified in (A) uRBC, (B) iRBC or (C) *P. falciparum*. Blue circles indicate categories of proteins that are absent in uRBC.

Figure 3.S9. Clathrin-mediated endocytosis signalling pathway by Ingenuity. IPA analysis integrates this canonical pathway in (A) uRBC, (B) Rings, (C) Trophozoites and (D) Schizonts. In red are indicated enriched components. In gray are represented components enriched in other phases of the IDC. In white color, non-identified components are represented.

Figure 3.S10. Comparison of the data obtained in this study with the data published by *Ponts et al.* (A) Total and (B) enriched identified proteins were compared. Comparison of different phases of the IDC and uRBC.

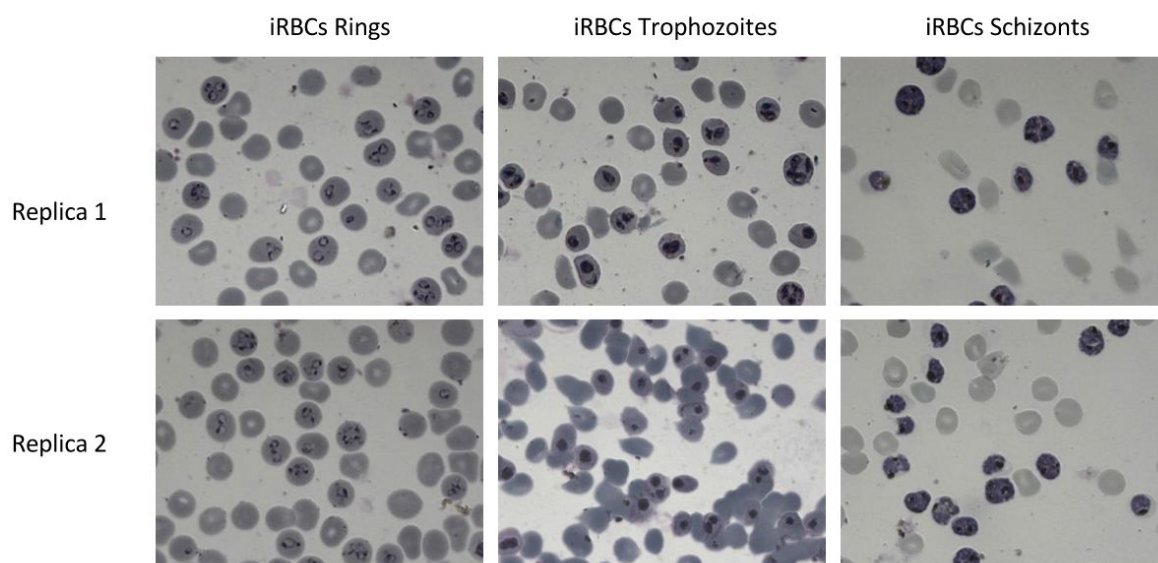


Figure 3.S 1

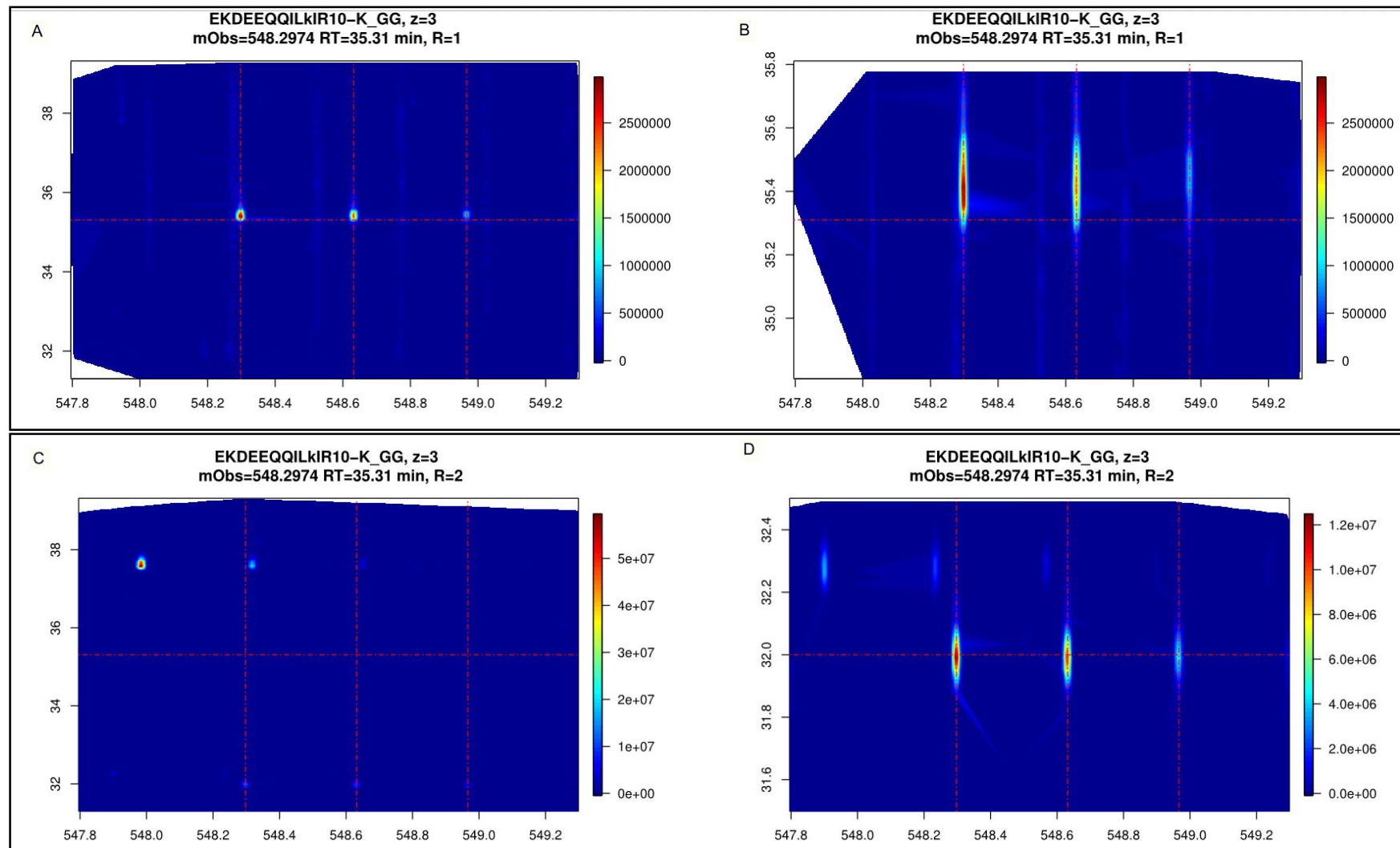


Figure 3.S 2

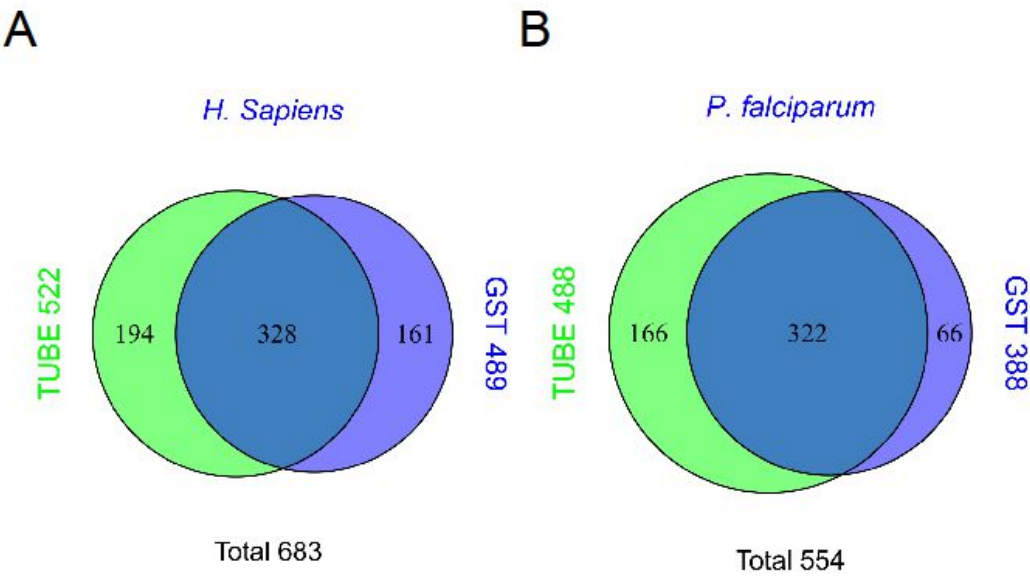


Figure 3.S 3

GO BP enrichment analysis

H. sapiens

P. falciparum

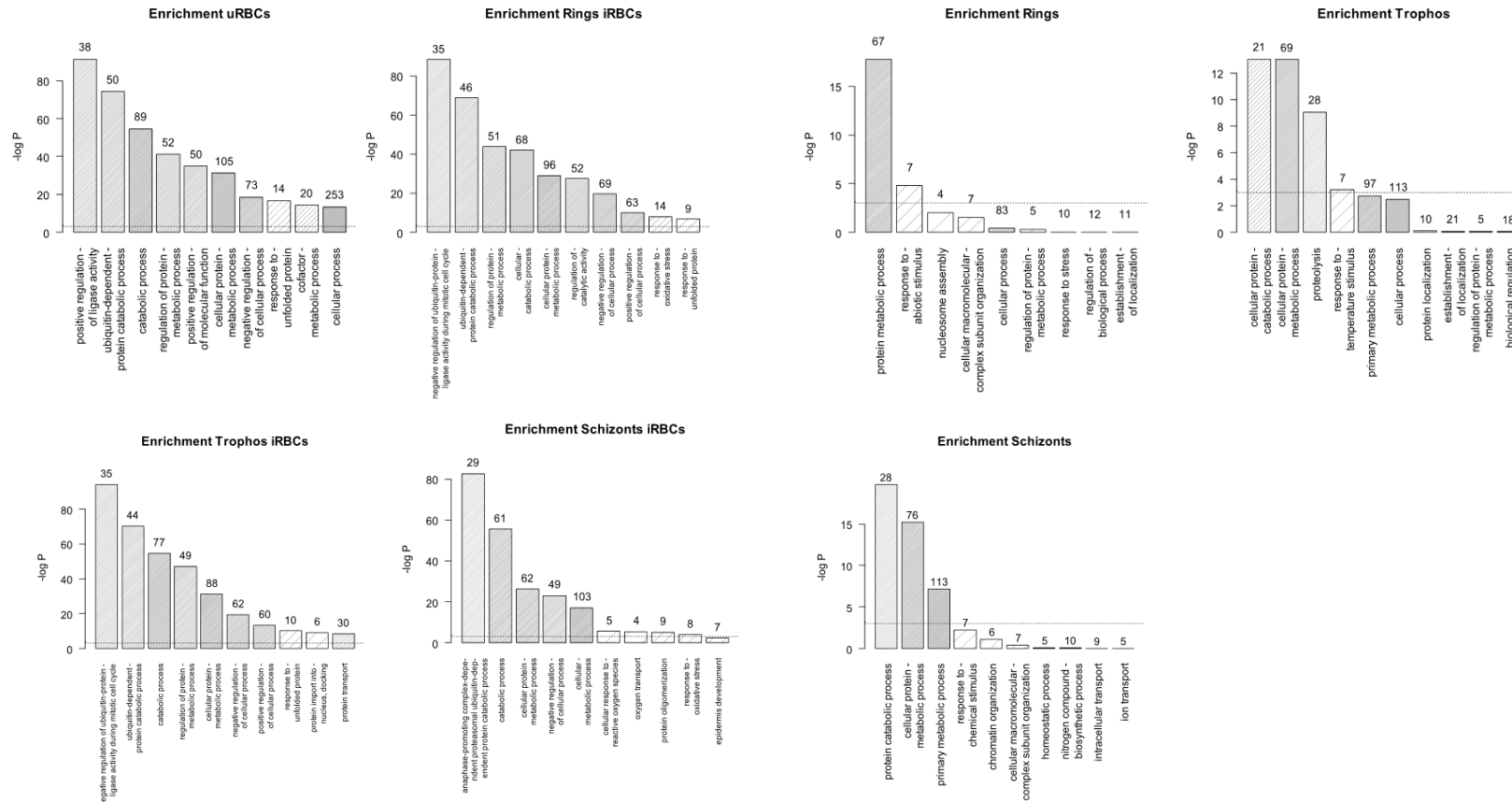


Figure 3.S.4

GO CC enrichment analysis

H. sapiens

P. falciparum

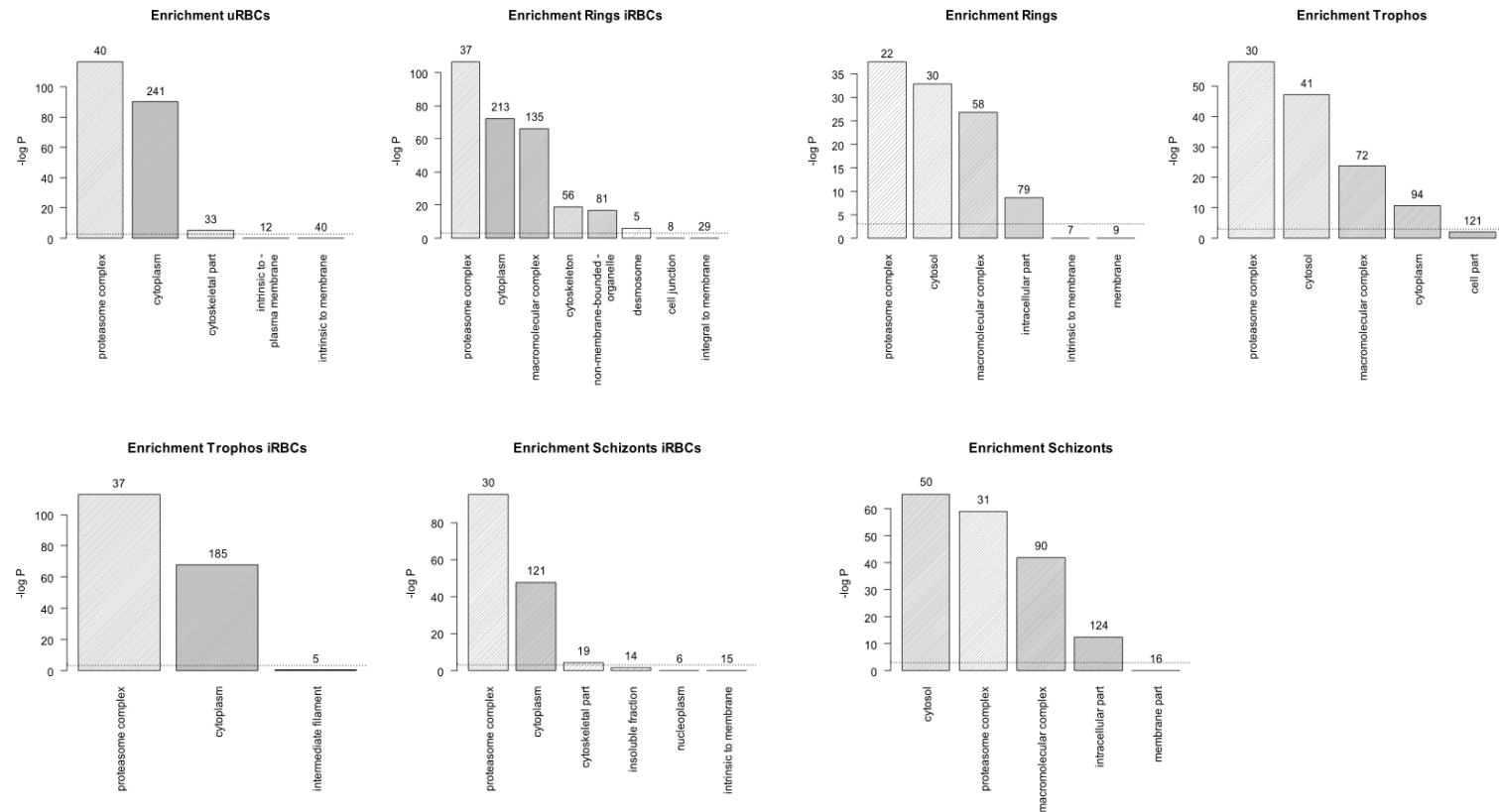


Figure 3.S 5

GO MF enrichment analysis

H. sapiens

P. falciparum

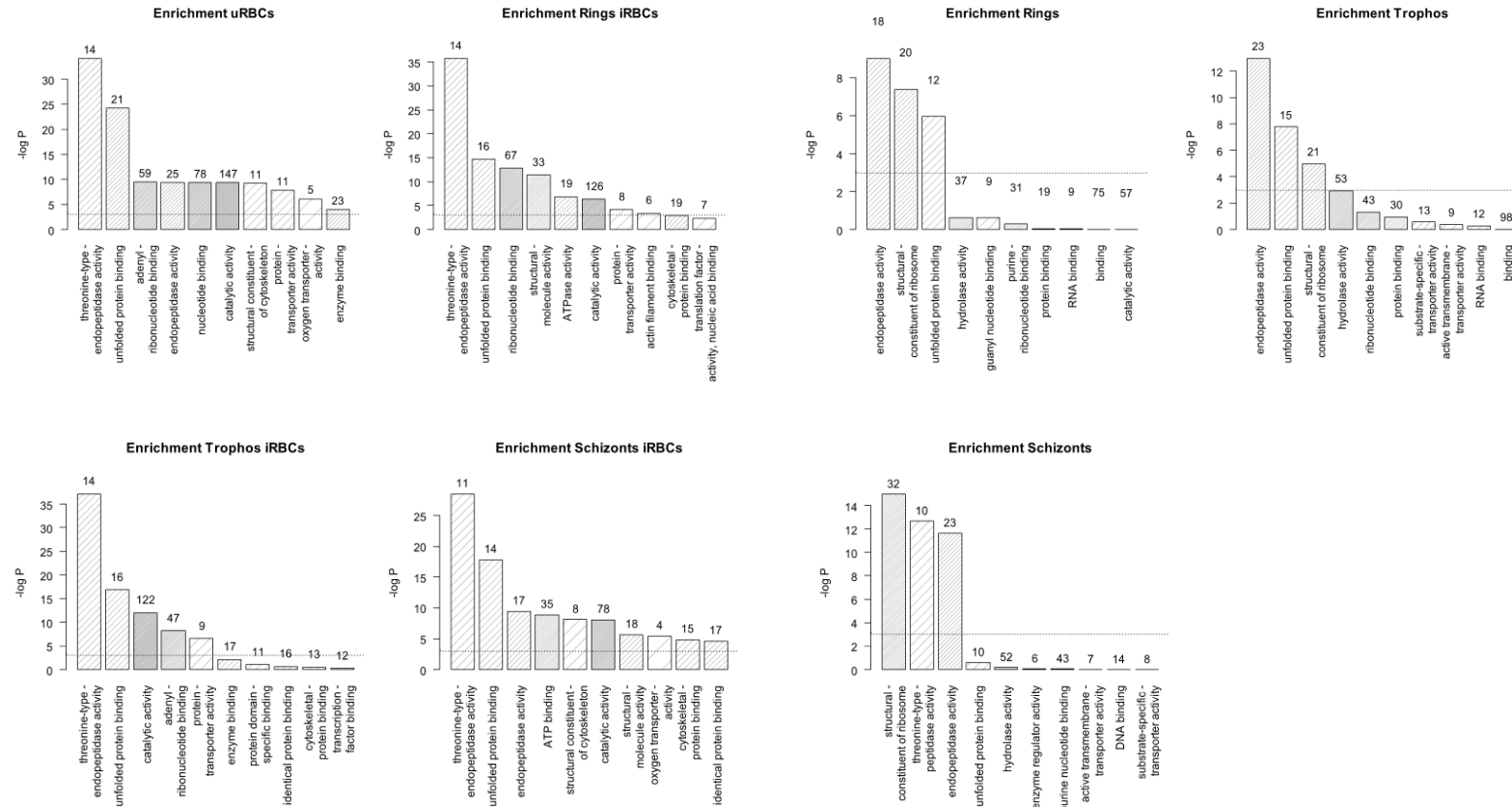
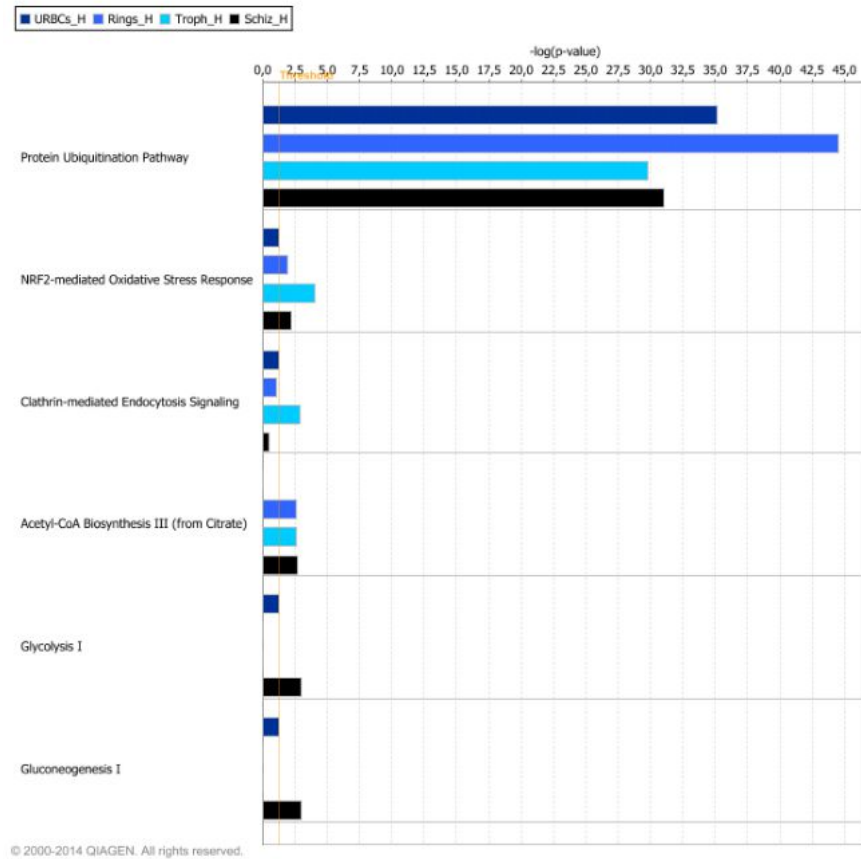


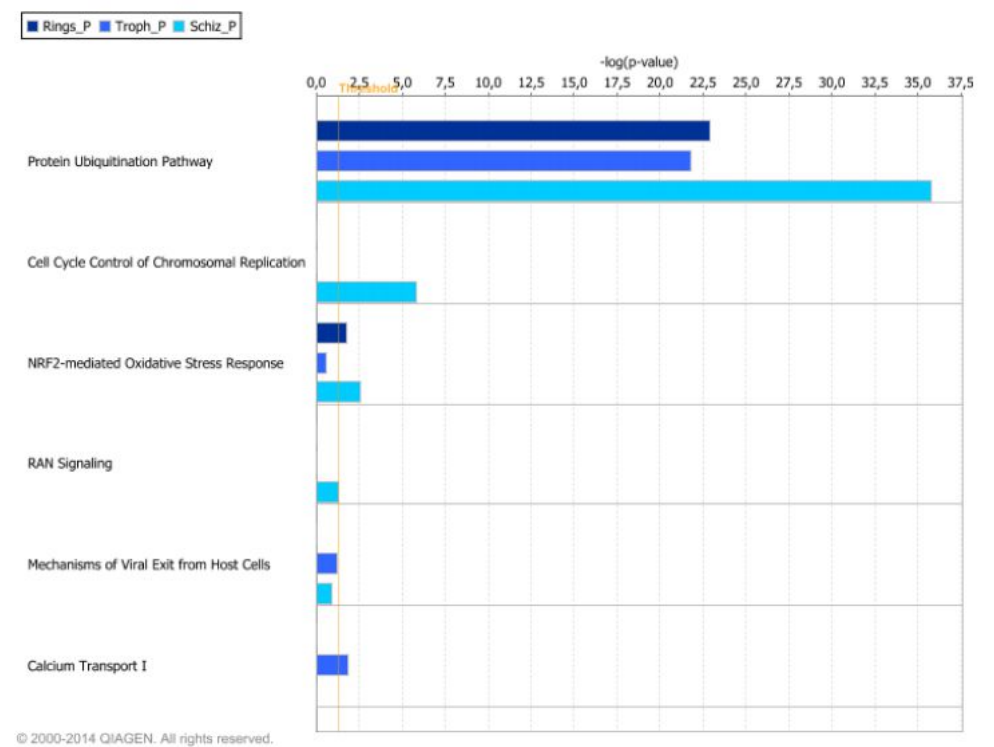
Figure 3.S 6

A



H. sapiens

B



P. falciparum

Figure 3.S 7

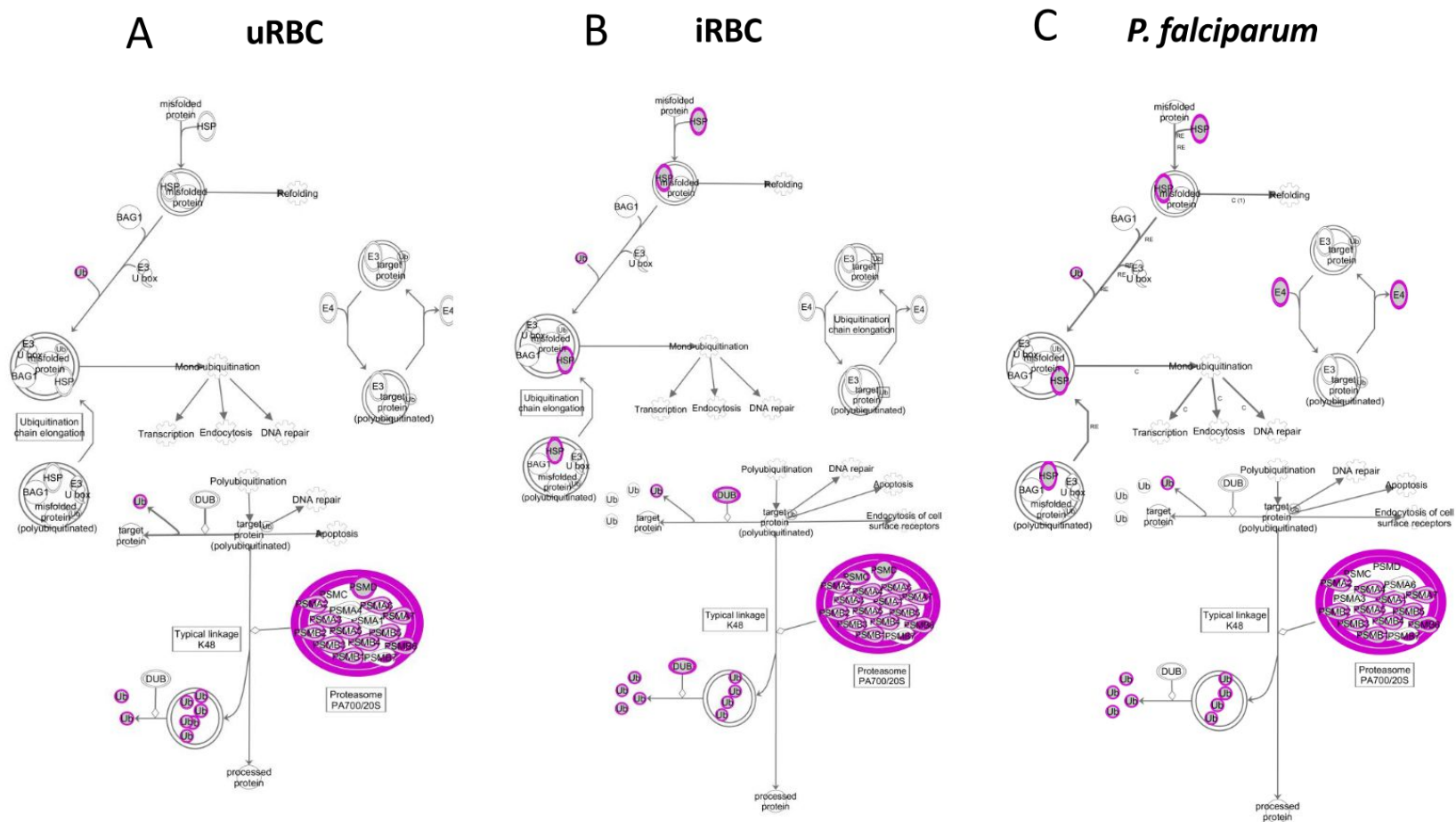
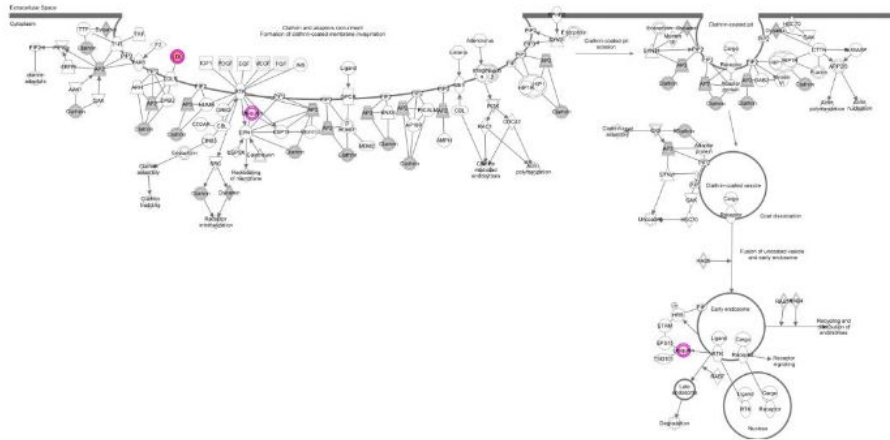
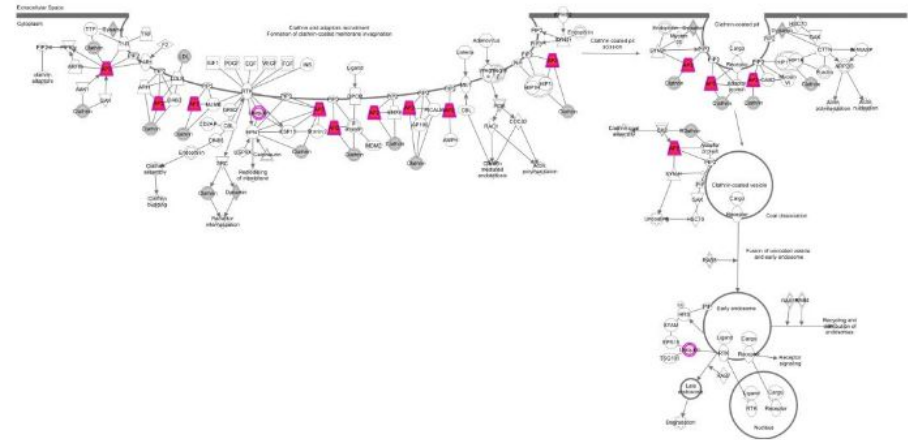


Figure 3.S 8

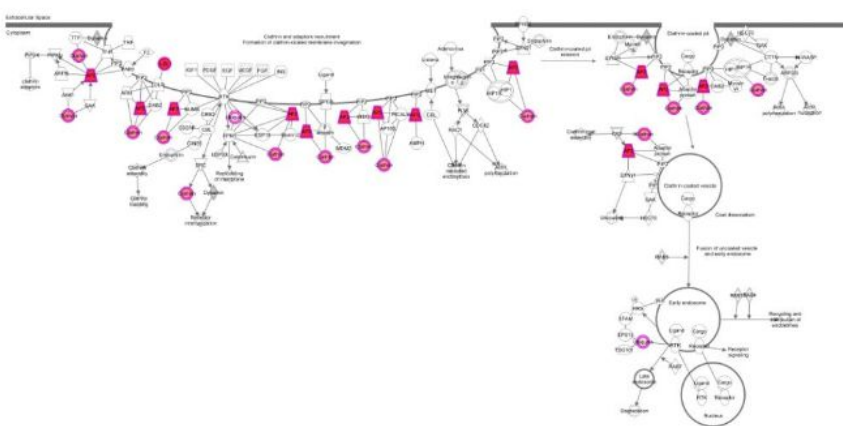
A



B



C



D

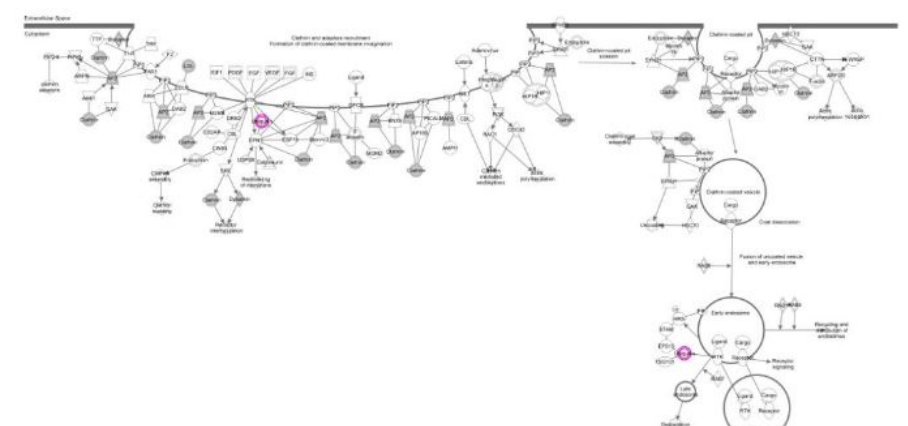


Figure 3.S 9

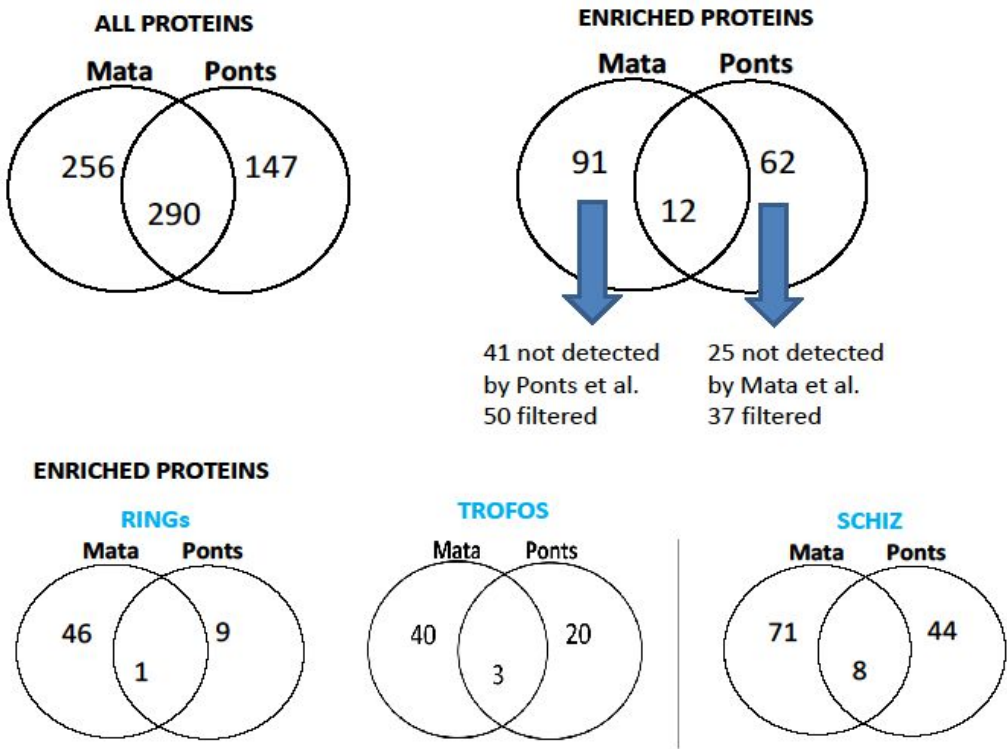


Figure 3.S 10

CAPÍTULO 4

Development of two novel High-throughput assays to quantify ubiquitylated proteins in cell lysates: Application to screening of new antimalarials

Mata-Cantero L^{1*,2,3}, Cid C², Gomez-Lorenzo MG¹, Xolalpa
W³, Aillet F³, Martín-Plaza J², Rodriguez MS³.

Author details

¹Medicines Development Campus, Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline Tres Cantos, Madrid, Spain

²Centro de Investigación Básica, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain.

³Ubiquitylation and Cancer Molecular Biology, Inbiomed, Mikeletegi 81, 20009, San Sebastian, Spain.

*Present address

Published in *Malaria Journal*, 2015, 14: 200. doi: 10.1186/s12936-015-0708-1

4.4. CAPÍTULO 4

Development of two novel high-throughput assays to quantify ubiquitylated proteins in cell lysates: Application to screening of new antimalarials

ABSTRACT

Background: The ubiquitin proteasome system (UPS) is one of the main proteolytical pathways in eukaryotic cells and plays an essential role in key cellular processes such as cell cycle, stress response, signal transduction, and transcriptional regulation. Many components of this pathway have been implicated in diverse pathologies including cancer, neurodegeneration and infectious diseases, such as malaria. The success of proteasome inhibitors in clinical trials underlines the potential of the UPS in drug discovery.

Methods: *Plasmodium falciparum*, the malaria causative pathogen, has been used to develop two assays that allow the quantification of the parasite protein ubiquitylation levels in a high-throughput format that can be used to find new UPS inhibitors.

Results: In both assays tandem ubiquitin binding entities (TUBEs), also known as ubiquitin traps, have been used to capture ubiquitylated proteins from cell lysates. The primary assay is based on AlphaLISA technology, and the orthogonal secondary assay relies on a dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay (DELFI) system. A panel of well-known proteasome inhibitors has been used to validate both technologies. An excellent correlation was obtained between these biochemical assays and the standard whole cell assay that measures parasite growth inhibition.

Conclusions: The two assays presented can be used in a high-throughput format to find new UPS inhibitors for *P. falciparum* and could help to identify new targets within this system. This methodology is also applicable to other cellular contexts or pathologies.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Malaria, Ubiquitin proteasome system, High-throughput screening, Tandem ubiquitin binding entities, Cellular assay, Drug discovery

1. INTRODUCTION

Plasmodium falciparum is responsible for the most severe form of human malaria. Spreading resistance to current treatments urges the need for new medicines with novel modes of action. After decades pursuing target-based programmes, the focus now is on phenotypic screenings, as the knowledge of the biology of the parasite is limited and, at least in theory, inhibitors of any essential pathway of the parasite could be found. One such essential pathway is the ubiquitin proteasome system (UPS) which consists in a covalent, post-translational modification that orchestrates the function and turnover of numerous cellular proteins and regulates many essential cellular processes, such as cell cycle progression, transcription, endocytosis, DNA repair, apoptosis, signal transduction, differentiation, cellular stress, and protein trafficking. Alterations of the UPS have been implicated in a large number of diseases, including many cancer types, neurodegenerative and immunological disorders, and also infectious diseases. Therefore, the UPS has become one of the most promising targets for drug development [1].

The UPS consists of multiple enzymes and cofactors that regulate the attachment/detachment of ubiquitin to target proteins before being exposed to the 26S proteasome. Ubiquitin is a highly conserved protein among eukaryotes showing only few amino acid differences between mammalian and yeast versions [2]. The protein modification process, also known as conjugation, requires three sequential steps that start with the activation of the C-terminal glycine residue of the ubiquitin by an ubiquitin-activating enzyme (E1), which forms a thiolester linkage with ubiquitin. This activated ubiquitin is transferred to an ubiquitin-conjugating enzyme (E2) and then to an ubiquitin-ligase (E3) that specifically interacts with the protein substrate. The C-terminal glycine of ubiquitin is attached to an amino group of a lysine present in the substrate. Additionally, ubiquitin has

seven active lysines that can accept ubiquitin moieties generating different types of polyubiquitin chains. Some polyubiquitin chains have been associated with specific cellular functions. For example, K63 chains that activates signalling cascades or K48 and K11 chains that are linked to protein degradation by the proteasome. The process can be reverted by the action of deubiquitylating enzymes (DUBs) that are responsible for the dynamic equilibrium of the system.

The 26S proteasome is a multi-subunit complex formed by a 20S core particle, responsible for the catalytic activity, and by regulatory 19S particles flanking each end of the core to control the entry of ubiquitylated proteins. The 20S core consists of four heptameric rings, the two outer rings are formed by alpha sub-units and the two inner rings are composed of beta sub-units. $\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$ sub-units are responsible for the peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing (PHGH), the trypsin and the chymotrypsin-like activities of the proteasome, respectively [3].

Several UPS components have been considered as druggable targets since some of them are directly involved in different human diseases. Proteasome was the first successful target within the UPS. The proteasome inhibitor, Bortezomib reached clinical phases for the treatment of various types of cancer. Since its approval for the treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma in 2003, another four inhibitors of the UPS are in clinical trials and seven more are in preclinical studies [4-7]. The efficacy and limited toxicity of these inhibitors are based on the fact that rapidly dividing cancer cells are more sensitive than non-dividing ones suggesting that very active processes will be better blocked by UPS inhibitors.

Plasmodium falciparum divides rapidly during its intraerythrocytic cycle (see Figure 4.1A), fulfilling the criteria to be targeted by a UPS inhibitor. Moreover, multiple evidence indicates that the UPS is involved in the parasite cell cycle progression and protein quality control [8,9]. Even though there is a conserved sequence homology between the parasite and human proteasome proteins, there is space for selectivity not only in the proteasome but also at specific components of the UPS such as E3 ligases and DUBs [10-12]. Targeting *P. falciparum* UPS can provide novel modes of action to overcome the emerging resistance to current treatments, as already demonstrated *in vitro* [13]. Indeed, proteasome inhibitors

can efficiently inhibit *P. falciparum*-resistant strains at various stages of the cycle in the nanomolar range and with limited toxicity to humans [13-15]. New inhibitors targeting specifically the parasite UPS are desirable [16] to reduce possible side effects.

Thus, the aim is to develop assays that can detect inhibitors of any of the steps involved in UPS, with a high throughput. Even though there are some assays published that measure UPS activity, they are based on quantifying proteasome activity, either biochemically or in cell-based assays using engineered strains. These assays give a large number of false positives and negatives and can be biased by a different homeostasis of the modified cell [17-21]. The effect of compounds on the whole UPS can also be assessed by measuring the total level of ubiquitylated proteins that are present in cell lysates after treatment. Proteasome inhibition causes an accumulation of ubiquitylated proteins that can be analyzed by Western blot [22]. However this method is costly and time consuming and hence is not suitable for high-throughput screening (HTS). Assays with higher throughput using TR-FRET and AlphaLISA in combination [23, 24] with tandem ubiquitin binding entities (TUBEs) [25], have also been published, but they are target-based approaches that make use of recombinant proteins. Moreover, they are limited to a precise activity within the UPS, therefore previous knowledge about the target is required.

Here, the development of two cellular assays to quantify the total pool of ubiquitylated proteins in *P. falciparum* cell lysates is presented, which can be used as primary and secondary assays in a HTS campaign to find inhibitors of the UPS as a whole, that is, inhibitors of any step that can significantly alter the level of ubiquitylated proteins. These assays are based on the use of TUBEs, which are tandem ubiquitin-associated domains (UBA) fused to a glutathione S-transferase (GST) or biotin tag that allow the purification of captured ubiquitin conjugates in native conditions after cell lysis. The tandem disposition of UBA domains increases the affinity for ubiquitin chains and also protects ubiquitylated proteins for DUBs-mediated deconjugation and proteasomal degradation [25-27].

The first assay developed is a homogeneous assay based on the AlphaLISA technology that can be used as a primary test to screen any compound collection to

identify molecules that putatively alter the levels of ubiquitylated proteins. The second technique is a heterogeneous dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay (DELFI) assay that can be useful to confirm the positive compounds found in the primary assay, and hence discard false-positive compounds associated with AlphaLISA technology. This heterogeneous assay requires washing steps, thus increasing the time of manipulation and results deviation and has higher associated costs when used for HTS. However, the advantage is the reduction of background interference by compounds and biological components of the assay. The DELFI assay could also be used independently as a primary assay during hit optimization process to assess the potency of compounds in dose-response experiments. Assays described here have been validated using a panel of well-known proteasome inhibitors and could be used to quantify the UPS activity in cells or to run HTS campaigns in order to find selective inhibitors of this pathway. These universal methods have been set up using *P. falciparum*-infected red blood cells (iRBCs) as the biological system to identify compounds that alter UPS, but conditions could be adapted easily to other cell types and pathologies or to study and/or find specific inhibitors of particular components of the UPS.

2. METHODS

2.1. Reagents

Hypoxanthine, sorbitol, percoll, MG132, Epoxomicin, Lactacystin, Clasto-Lactacystin β -lactone, Gliotoxin, MG115, EDTA, sodium phosphate dibasic, monosodium phosphate, Tris HCl, sodium chloride, Tween-20, sodium pyrophosphate, glycerol-2-phosphate, saponin, bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT) and phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma. Glutathione acceptor beads, protein A donor beads, DELFI enhancement solution and DELFI secondary antibody (Eu-N1 rabbit Anti-mouse-IgG) came from Perkin Elmer. NP-40 was purchased from Calbiochem, sodium fluoride from Panreac, antibody anti-ubiquitin P4D1 from Santacruz, deubiquitylases inhibitor PR619 came from Merck, complete mini EDTA protease

inhibitor cocktail from Roche, antibody anti-ubiquitin FK2 from Enzo, biotin-TUBEs from Life sensor, RPMI 1640 medium from Gibco, AlbuMAX II from Invitrogen, Bortezomib from Selleckchem, enhanced chemiluminescence (ECL) from GE Healthcare and PBS from Oxoid. Atovaquone was prepared in house.

2.2. *Plasmodium falciparum* cultures

All experiments were performed using *P. falciparum* strain 3D7A obtained from the Malaria Research and Reference Reagent Resource (MR4) [28]. Parasites were maintained in culture in T150 flasks in a 5% CO₂, 90% N₂ and 5% O₂ atmosphere, using RPMI 1640 medium supplemented with 5% AlbuMAX II, 150 µM hypoxanthine and fresh red blood cells (uRBCs) according to the methods previously described [29,30]. uRBCs were obtained from the Spanish Red Cross Blood Bank.

2.3. GST-TUBEs expression and purification

TUBEs tagged with GST were expressed in *Escherichia coli* C41 (DE3) as previously reported [25], although they are also available from Lifesensors. Expression of TUBEs was induced with 1 mM IPTG for 6 hrs at 20°C. Bacteria were lysed by sonication in PBS with 1% triton X-100 and 2 mM benzamidine and lysates were clarified by centrifugation at 20,000 rpm for 2 hrs at 4°C. TUBEs were purified by standard glutathione agarose beads following manufacturer instructions. Briefly, lysate was incubated with glutathione agarose beads for 2 hrs at 4°C and then these beads were washed with 1% triton X-100 in PBS. Recombinant TUBEs were eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl pH 9.5. After a buffer exchange to PBS (Amicon ultra centrifugal filter cut off 3 kDa) protein concentration was determined by absorbance at 280 nm.

2.4. Western blot analysis

Plasmodium falciparum cultures were synchronized with 5% w/v sorbitol enriching iRBCs in ring stage, and maintained for three days at 0.8% haematocrit and 2% parasitaemia as previously described [30]. Haematocrit is defined as the

volume percentage of RBCs and parasitaemia is the percentage of iRBCs in the culture. Then, a new synchronization cycle was done through a 70% percoll gradient (v/v) isolating iRBCs highly synchronized in schizont stage [30]. Culture was adjusted to 5% parasitaemia and 1% haematocrit with fresh uRBCs and grown for an extra day. Then, iRBCs were treated with proteasome inhibitors MG132 (1.15 μ M) or Epoxomicin (0.26 μ M) and incubated for 1 hr at 37°C at 20 times the IC50 that causes the parasite growth inhibition. Samples were taken at three different time points, time zero (rings), 14 hrs (trophozoites) and 24 hrs (schizonts). Atovaquone, an anti-malarial drug, was used at 0.02 μ M as a negative control since it does not target the UPS system. Cultures, without any treatment, were also taken to assess the basal levels of ubiquitylated proteins. *Plasmodium falciparum* cultures were pelleted by centrifugation at 600 g for 5 mins and frozen at -80°C for at least 24 hrs. Then, pellets containing the parasites were treated with 0.1% w/v saponin in PBS for 5 min at 4°C. Cells were centrifuged at 3,500 rpm for 5 min and washed three times with cold PBS to remove haemoglobin until the supernatant was clear. The cell pellets corresponding to purified parasites were resuspended in lysis buffer (50 mM NaF, 5 mM tetra-sodium pyrophosphate, 10 mM β -glyceropyrophosphate, 1% NP-40, 2 mM EDTA, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 1 mM PMSF and complete mini EDTA protease inhibitor cocktail) and lysed with two cycles of sonication (10 sec each). Lysates were cleared by centrifugation for 10 min at 14,000 rpm and 4°C and supernatant collected. Protein amount was quantified by Bradford. For each condition, equal amount of proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Roche) and incubated with anti-ubiquitin P4D1 antibody diluted 1:1,000 to analyse ubiquitylated proteins.

2.5. *Plasmodium falciparum* extracts for assay development

To set up the assays, *P. falciparum* parasites at schizont stage were isolated from RBCs to remove haemoglobin which causes interference in the AlphaLISA technology. *Plasmodium falciparum* cultures were synchronized with sorbitol and percoll as described in the previous section. Cells were grown for two days at 1% haematocrit and 5% parasitaemia. Then, cultures enriched with schizonts at 10%

parasitaemia were treated for 1 hr with the proteasome inhibitor MG132 at 1.15 μ M or kept without treatment as basal control, depending on each experiment. iRBCs were centrifuged at 600 g for 5 min and frozen at -80°C . Parasites were extracted with 0.1% w/v saponin, washed three times in PBS and then lysed by sonication in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl 1% Tween 20, complete mini-EDTA free anti-proteases, 1 mM PMSF, 50 μ M deubiquitylase inhibitor PR619 (DUBI), a cell-permeable broad spectrum inhibitor that does not affect the proteasome activity and it is used to protect against deubiquitylation processes in the lysis moment) as described above, obtaining a clear parasite protein lysate without haemoglobin. Lysates were then dispensed in 384-or 1,536-well plates to assess levels of ubiquitylated proteins by AlphaLISA or DELFIA assays under different conditions (see Results).

2.6. Purification of iRBCs with schizonts and treatment with compounds

The developed assays were designed to use *in vitro* *P. falciparum* iRBCs highly synchronized in schizonts following the protocol previously described [30]. Briefly, *P. falciparum* cultures were synchronized using sorbitol and percoll treatments as described above. Cultures adjusted to 5% parasitaemia and 1% haematocrit after percoll synchronization were grown for 48 hrs and then passed through magnetic MACs columns type CS (Miltenyi biotec). These columns only retain RBCs that are infected with mature forms of *P. falciparum*, enriching the elute with a parasitaemia of iRBCs in schizont stage up to 98%. Cells were pelleted by centrifugation at 600 g for 5 min and adjusted with supplemented RPMI 1640 medium to 0.4% haematocrit for AlphaLISA and 0.2% haematocrit for DELFIA assay. Cultures were kept in the incubator at 37°C for 1 hr and then dispensed into plates containing proteasome inhibitors: 2 μ L in 1,536-well white plates (Greiner) containing 20 nL of compound for AlphaLISA and 20 μ L in 384-, flat-bottom, black plates containing 200 nL of compound for DELFIA assay. Proteasome inhibitors were dissolved in 100% DMSO, being 1% the final DMSO concentration in the assays. Plates with iRBCs and compounds were incubated at 37°C for 1 hr and then frozen at -80°C .

2.7. TUBE-AlphaLISA assay

Assay was set up in 1,536-well white plate, in which 2 μ L of each reagent were added per well and step, reaching all together a final volume of 10 μ L. Frozen plates containing 2 μ L of iRBCs and 20 nL of compounds (as described in the previous section) were thawed, to avoid deconjugation processes, in presence of 2 μ L of lysis buffer containing TUBEs (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 50 μ M DUBI, complete mini-EDTA free anti-proteases, 1 mM PMSF and 25 μ g/mL GST-TUBEs). Lysis was performed by three fast freeze/thaw cycles (10 min each) and then the plates were kept at room temperature for 1 hr to enable the efficient capture of ubiquitylated proteins by the GST-TUBEs. Two μ L of AlphaLISA GSH acceptor beads at 0.1 μ g/ μ L diluted in AlphaLISA assay buffer (100 mM sodium phosphate buffer pH 7, 0.1% BSA) with 7.5 mM DTT were added. Plates were sealed and incubated for 4 hrs at 4°C to allow the binding of GSH beads with the GST-TUBEs. Then, 2 μ L of anti-ubiquitin FK2 antibody (diluted 1:80 in AlphaLISA assay buffer) was dispensed and incubated for 1 hr at 4°C in darkness. Finally, 2 μ L of protein A donor beads at 0.2 μ g/ μ L (in assay buffer) were added and plates were incubated in darkness at 4°C overnight, enabling the binding of the FK2 antibody and the donor beads. The levels of ubiquitylated proteins were determined by measuring the light emission at 615 nm in the Envision multilabel reader (Perkin Elmer) using the AlphaLISA protocol.

2.8. TUBE-DELFI assay

In a typical assay, the addition of each reagent was preceded by six washing steps with 100 μ L of TBS-Tween (50 mM Tris HCl, 2.7 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.05% Tween 20) to remove the unbound fraction. The day before the assay, streptavidin 384-well black plate (Greiner) was incubated overnight at 4°C with 20 μ L of 1.5 ng/ μ L biotin-TUBEs in PBS to allow binding of the TUBEs to the plate. Then, plates were washed with TBS-Tween and 10 μ L of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 50 μ M DUBI, complete mini-EDTA free anti-proteases, 1 mM PMSF) was added. The 384-plates prepared previously (see above) that contained iRBCs incubated with compounds were thawed and 10 μ L of the culture was transferred to the streptavidin plates

containing TUBEs and lysis buffer. iRBCs lysis was performed applying three freeze/thaw cycles (10 min each) and then these streptavidin plates were incubated for 1 hr at room temperature in a microtitre-plate shaker to favour the capture of all the ubiquitylated proteins by the TUBEs. After washing the plates to remove the unbound proteins, 10 µL of antibody anti-ubiquitin FK2 diluted 1:200 in DELFIA assay buffer (50 mM Tris HCl 7.5, 20 µM EDTA, 500 mM NaCl, 0.01% Tween 20 and 0.1% BSA) was added and incubated for 1 hr at room temperature under low shaking. Then plates were washed and an additional incubation with 10 µL of DELFIA secondary antibody (diluted 1:200 in DELFIA assay buffer) was performed for 1 hr, followed by the last washing cycles. Finally, 25 µL of the enhancement solution was added, which causes the release of the europium. Plates were then incubated for at least 15 min at room temperature with shaking before reading. Fluorescence signal from europium was recorded in the Envision plate reader using a protocol for time-resolved fluorescence with excitation at 340 nm and emission at 615 nm. The long fluorescence lifetime of europium enables the use of time-resolved fluorimetry to eliminate background interferences.

2.9. Data analysis

The effect of compounds was calculated taking as reference the basal level of ubiquitylated proteins in iRBCs (control 1 = basal levels of ubiquitylated proteins in cell lysates in 1% DMSO, in the absence of compound). The increase in the levels of the ubiquitylated proteins was calculated using the stimulation formula: % stimulation = $100 \times (\text{sample} / \text{control 1})$, being 100% the basal levels without stimulation (control 1). Compounds that inhibit the proteasome activity will cause an increase in the levels of ubiquitylated proteins, and hence an increase in the AlphaLISA or DELFIA signals. Samples above the cut-off (calculated as the average of control 1 plus three times its standard deviation) were considered positives. TIBCO Spotfire 3.2 software was used to perform this analysis.

In the dose response graphs, all curves were normalized between 0 and 100% inhibition. Maximum levels of ubiquitylated protein for each compound were considered as 100% of UPS inhibition (B). Minimum levels of ubiquitylated proteins (0%) were the basal levels without any treatment (A). Data were

calculated normalizing the raw counts with respect to the minimum (A) and maximum (B) counts per compound ($\% inh = 100 - (100 * (sample - B)/(A - B))$). pIC50s ($-\log$ molar IC50) were calculated and represented using GraFit 5 (Erithacus Software, Horley, Surrey, UK).

3. RESULTS

3.1. Assessment of the levels of ubiquitylated proteins at different parasite stages

Plasmodium falciparum intraerythrocytic cycle, which includes rings, trophozoites and schizonts stages (Figure 4.1A) were used to set up the assays as it is related with its pathogenesis and is the primary target of anti-malarial drug development. Total amount of ubiquitylated proteins at each stage of the intra-erythrocytic cycle was analyzed by Western blot using anti-ubiquitin P4D1 antibody. Figure 4.1B shows the levels of ubiquitylated proteins in parasite extracts (see Methods – “*Plasmodium falciparum* extracts for assay development”) during ring, trophozoite and schizont stages. The levels of ubiquitylated proteins increased along the cycle, reaching the highest concentration in schizonts in accordance with previously reported data [9].

To determine the stage containing the largest accumulation of ubiquitylated proteins after treatment with a UPS inhibitor, two different proteasome inhibitors were used: the well-known MG132 and Epoxomicin. iRBCs with *P. falciparum* at different stages were treated for 1 hr with these proteasome inhibitors. Atovaquone was used as negative control, as its mode of action is not related to UPS. *Plasmodium falciparum* proteins were isolated and then quantified by Bradford to normalize the amount of proteins loaded in the gel. As expected, Atovaquone did not change the amount of ubiquitylated proteins while MG132 and Epoxomicin treatments resulted in an accumulation of ubiquitylated proteins at schizont stage of 1.8 and 1.5 times, respectively, when compared to the basal levels (Figure 4.1C), correlating with previously published data [9]. Taking into account these results, parasites at schizont stage were used for further assays.

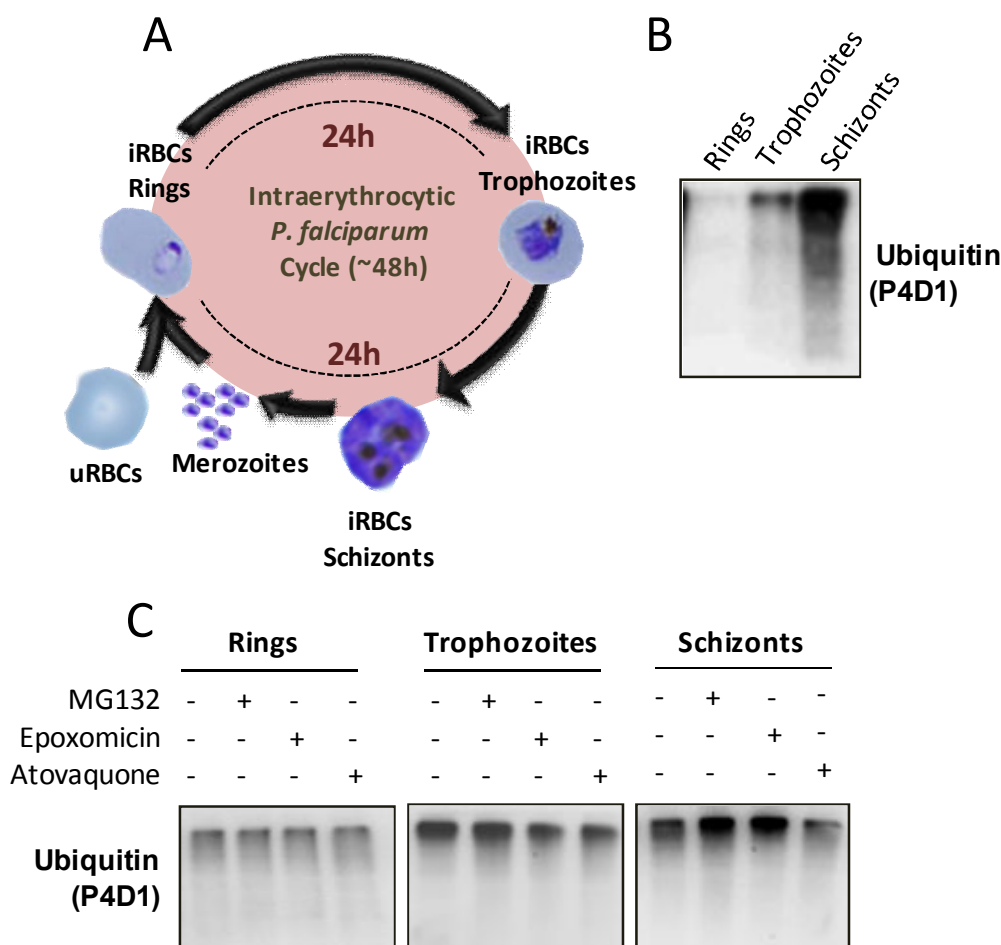


Figure 4. 1. Analysis of ubiquitylated proteins along *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic cycle. **A)** Schematic representation of the parasite cycle in blood stages. It starts when merozoites invade uRBC resulting in the first phase called ring stage. After 24 hrs, the parasite enters in a phase with high metabolic activity, the trophozoite. A few hours later, at the schizont stage, the parasite produces merozoites that will rupture the RBC membrane, looking for new uRBCs to invade and start a new cycle. **B)** Western blot analysis with P4D1 antibody shows basal levels of ubiquitylated proteins in rings, trophozoites and schizonts. **C)** Effect of proteasome inhibitors MG132 (1.15 μ M) and Epoxomicin (0.26 μ M), on the levels of ubiquitylated proteins from rings, trophozoites and schizonts. Atovaquone at 0.02 μ M was used as negative control.

3.2. Set-up of a homogenous AlphaLISA assay to measure the levels of ubiquitylated proteins from cell lysates

The aim was to establish a universal assay to measure the total amount of ubiquitylated proteins from cells, under native conditions, in a HTS format and based on ubiquitin-traps (TUBEs) that specifically capture and protect ubiquitylated proteins with high affinity. To set up this biological assay, *P.*

falciparum iRBCs were used with the added challenge of dealing with the abundant haemoglobin present in the host cells.

Initially, the TR-FRET technology was tested using many combinations of tagged-TUBEs, antibodies and fluorophores but results were not successful, maybe due to the large distance between the fluorophore pair. Different combinations of antibodies, beads and tagged TUBEs were also tested using the AlphaLISA technology, which enables the detection of larger complexes than TR-FRET. Only one combination among tens tested was successful, which is indicated in Figure 4.2A. All these failed attempts reflect the difficulty of establishing this method to detect levels of ubiquitylated proteins in cell lysates, with the added difficulty of the presence of interfering haemoglobin. Glutathione present on AlphaLISA acceptor beads recognizes the GST-tag of the TUBEs, which tightly interact with ubiquitylated proteins present in cell extracts. These ubiquitin moieties covalently linked to the proteins are also recognized by the ubiquitin antibody FK2. Protein A AlphaLISA donor beads bind to Fc domain of this anti-ubiquitin antibody. Therefore, only in presence of ubiquitylated proteins of the extracts AlphaLISA beads are close enough to enable the energy transfer. The excitation of the protein A donor beads by a laser beam at 680 nm produces the release and diffusion of singlet oxygen molecules that react with a thioxene derivative in the acceptor beads, generating chemiluminescence at 370 nm. This reaction further activates fluorophores present on the same bead that subsequently emit light, which can be detected at 615 nm. The signal emitted by the acceptor beads is proportional to the amount of polyubiquitin chains present in the cells. Singlet oxygen falls to the ground state and no signal is produced in absence of the complex.

In order to determine the optimal amount of each component, proteins from cell extracts, TUBEs, antibody, and beads were titrated, keeping all other components fixed. BSA (0.1%) was added to the AlphaLISA assay buffer and Triton X-100 to the lysis buffer to decrease the non-specific binding. DTT (1.5 mM) was also added to keep the glutathione reduced and optimize glutathione/GST-TUBEs recognition. To avoid interferences coming from the haemoglobin present in RBCs, during the assay development the source of ubiquitylated proteins came from isolated and lysed *P. falciparum* parasites (see Methods, "Purification of iRBCs with

schizonts and treatment with compounds”). The determination of the optimal amount for each reagent is shown in Figure 4.3. Figure 4.3A shows a cross-titration of TUBEs and *P. falciparum* cell extracts. Beads concentration was fixed at 10 µg/mL and FK2 antibody was used at 1:200. Signal was normalized with respect to the basal level obtained in each condition. No signal was detected in absence of TUBEs or *P. falciparum* cell extracts. AlphaLISA counts were directly dependent on both components as expected, reaching a maximum at the optimal concentration of 100 ng of TUBEs.

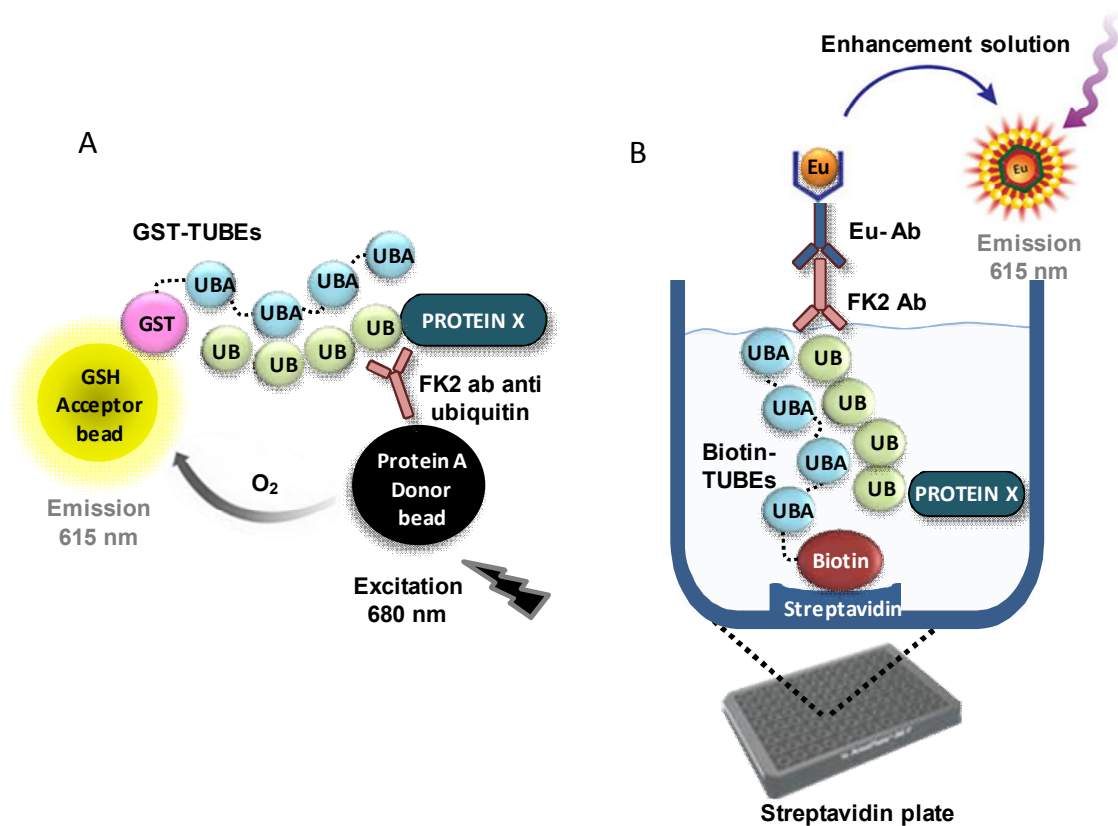


Figure 4. 2. Schematic representation of the developed assays. A) TUBE-AlphaLISA assay. Ubiquitylated proteins from cell lysates are captured by the GST-TUBE trap during the lysis. The GST-TUBEs trap binds to GSH AlphaLISA acceptor beads. FK2 antibody recognizes and binds to ubiquitin chains covalently attached to substrates and it is recognized by the protein A AlphaLISA donor bead. AlphaLISA donor bead is excited at 680 nm releasing singlet oxygen that diffuses towards the acceptor bead. After excitation acceptor bead emits light at 615 nm. **B) Schematic representation of TUBE-DELFI assay.** *P. falciparum* iRBCs are lysed in presence of biotin-TUBEs attached to streptavidin coated plates. Ubiquitylated proteins from cell lysates captured by the TUBEs ubiquitin traps are then immunodetected by the anti-ubiquitin FK2 mouse antibody which is recognized by a secondary antimouse antibody labeled with europium. The addition of the enhancement solution causes the release of the europium generating signal at 615 nm. Washes are required before each incubation step to remove unbound proteins/reagents.

Plasmodium falciparum cell extracts at 1.3 µg/well were chosen for subsequent assays, because at this concentration the system is able to detect both increased or decreased amounts of ubiquitylated proteins within the linear range (0.4-4 µg/well). Figure 4.3B shows the concentration curve for TUBEs at fixed amount of 1.3 µg of *P. falciparum* cell extracts. Beyond the optimal concentrations stated before, a decrease in the signal was observed due to a 'Hook effect', a common phenomenon found in AlphaLISA assays. The Hook effect occurs when beads are saturated with analyte. Thus, excess of analyte disrupts associations between donor and acceptor beads, causing a progressive decrease in the signal. Next, we studied the effect of the antibody concentration on the assay using 10 µg/mL of beads and the conditions previously established for TUBEs (100 ng) and *P. falciparum* cell extracts (1.3 µg) (Figure 4.3C) were studied. Maximum signal of the system was reached when antibody was used at the optimal dilution 1:400. Finally, a titration of AlphaLISA acceptor and donor beads was performed to determine their optimal concentrations (Figure 4.3D). A Hook effect was observed again, showing a maximum signal at 20 µg/mL of acceptor beads for any donor beads concentration. Figure 4.3E shows the titration of the donor beads with 20 µg/mL of acceptor beads. Beads concentration for further experiments was fixed at 20 µg/mL acceptor beads and 40 µg/mL donor beads.

As explained above, the optimal concentration of each component was established using isolated *P. falciparum* cell extracts, that is, lysed parasites in which haemoglobin was washed off to avoid interferences in the read-out. As the final objective was to develop an assay sensitive enough to detect changes in the level of the total parasite ubiquitylated proteins inside the iRBCs, the optimum haematocrit (percentage of the volume of RBCs *versus* total volume) for *P. falciparum* iRBCs at 100% parasitaemia was determined, as well as the assay sensitivity in presence of an UPS inhibitor. Figure 4.3F shows iRBCs with schizonts at 100% parasitaemia, treated for 1 hr with the proteasome inhibitor MG132 at 1.5 µM. These iRBCs prepared at different haematocrits were added to the plates and then levels of ubiquitylated proteins were measured with the AlphaLISA assay using the conditions previously established.

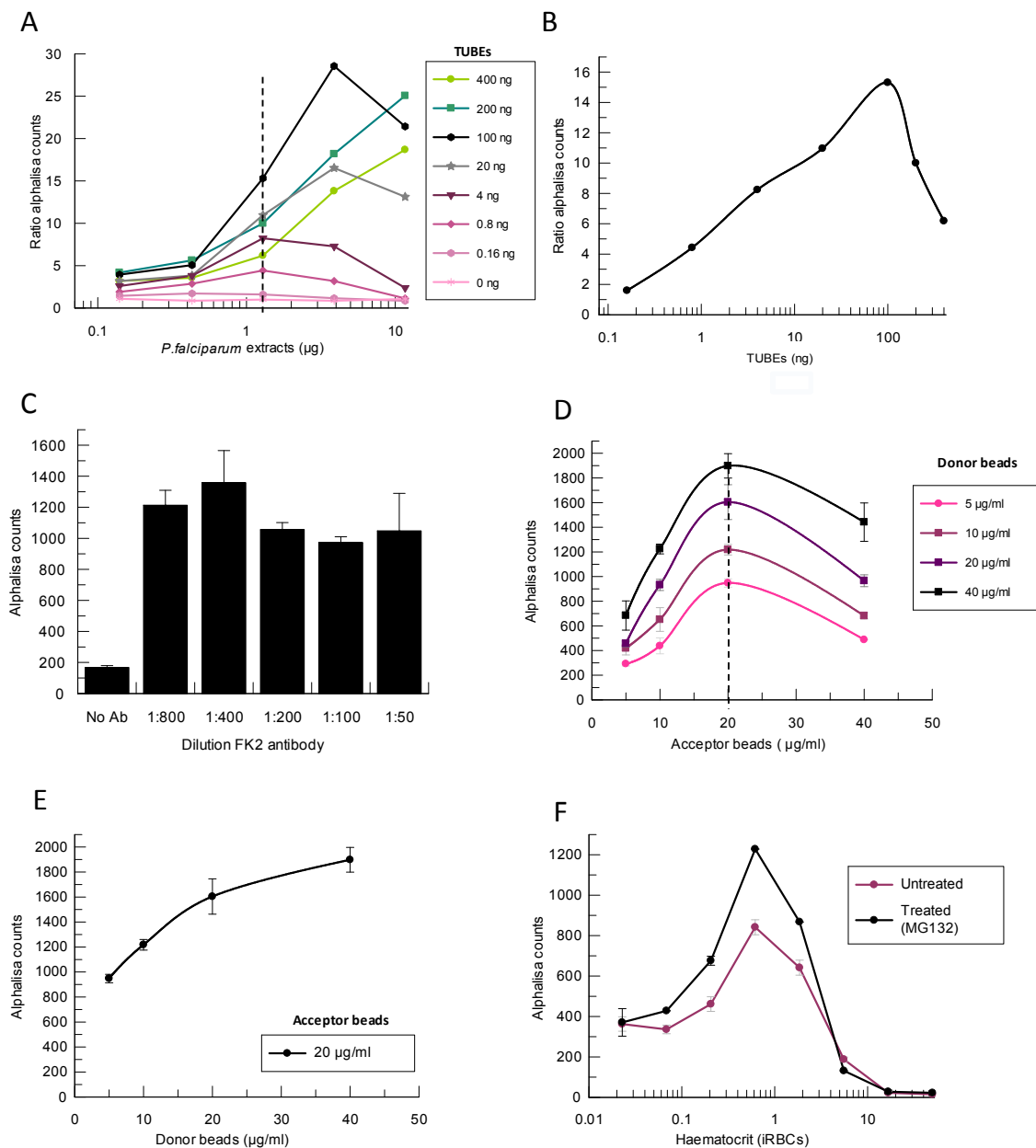


Figure 4. 3. Optimization of the components of the AlphaLISA assay. Different panels show the titration of all the reagents. X axis of A, B and F panels are represented in logarithmic scale. **A)** Cross titration of TUBEs and ubiquitylated proteins present in *P. falciparum* cell extracts, using 10 μg/mL of beads and 1:200 FK2 antibody dilution. Signal is represented as the ratio of AlphaLISA counts in presence and absence of TUBEs. **B)** Concentration curve of TUBEs at 1.3 μg of *P. falciparum* cell extracts. **C)** Titration of the anti-ubiquitin FK2 antibody with 100 ng TUBEs, 1.3 μg *P. falciparum* cell extracts and 10 μg/mL of beads. **D)** Cross titration of AlphaLISA donor and acceptor beads at conditions previously determined (100 ng TUBEs, 1:400 FK2 antibody and 1.3 μg of *P. falciparum* cell extracts). **E)** Titration of donor beads at 20 μg/mL of acceptor beads. **F)** iRBCs with schizonts at 100% parasitaemia and adjusted to different haematocrits with and without treatment of MG132.

A range of haematocrit between 0.2 and 2% generated an acceptable signal compared to background (ratio of accumulated ubiquitylated proteins in presence of MG132 *versus* basal levels) despite haemoglobin interferences with the AlphaLISA signal. Thus, haematocrit 0.4% of purified iRBCs with schizonts was chosen for further AlphaLISA assays, as this concentration was within the linear range and allow the detection of an increased amount of proteins in presence of the proteasome inhibitor MG132.

Besides the optimization described above, other critical protocol settings, such as order of addition, binding, incubation time of antibodies and beads, procedures for cell lysis in the 384- and 1,536-well plates, temperature and volume of different components of the assay were analyzed and included in the final protocol described in Methods. The assay was adapted to 384- and 1,536-well plate format obtaining a similar signal to background ratio. The 1,536-well format was chosen for future HTS campaigns whose results will be published elsewhere.

3.3. Heterogeneous DELFIA assay to measure the levels of ubiquitylated proteins from cell extracts

AlphaLISA technology is quite similar to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). It is a selective, sensitive and versatile technique and has the additional advantage that it allows performing assays in high-throughput format since washing steps are not required. However, the absence of washing steps also favours interferences that can appear in the screening of large collections of compounds, producing false positive or negative signals. A confirmatory assay to measure the levels of ubiquitylated proteins is desirable to identify possible interferences of the previous AlphaLISA assay or if high throughput is not required. Therefore, an orthogonal ubiquitin ELISA assay based on TUBEs and DELFIA technology has been established. DELFIA assay is a heterogeneous method that requires washing steps after each addition to remove unbound reagents. Advantages and disadvantages of these AlphaLISA and DELFIA assays are reflected in Table 4.1.

DELFIA assay was developed using biotin-tagged TUBEs to anchor ubiquitin-traps to the 384-well, streptavidin-coated plates. After treatment with the

compounds, cells are plated and lysed in the presence of TUBEs, which recognizes ubiquitylated proteins with high affinity and prevents proteasome-mediated proteolysis or DUB-mediated deconjugation processes. Anti-ubiquitin FK2 antibody binds ubiquitylated proteins and it is recognized by an anti-mouse DELFIA antibody labelled with europium (Figure 4.2B). This DELFIA sandwich is then treated with enhancement solution to release europium from the secondary antibody, producing signal at 615 nm that is proportional to the amount of ubiquitylated proteins present in the well. Each component of the assay was optimized in a similar way as described for AlphaLISA assay (Figure 4.4).

Table 4. 1. Advantages and disadvantages of these new AlphaLISA and DELFIA assays

	Advantages	Disadvantages
AlphaLISA	<ul style="list-style-type: none"> • High throughput: • Homogeneous: mix and measure assay eliminating washing steps • Save time and work • 1,536 well plate format 	<ul style="list-style-type: none"> • Prone to interferences: aggregating compounds (false positive), chemical or colour quenchers (false negative)
DELFIA	<ul style="list-style-type: none"> • Lower interference: • Compounds and non-specific assay reagents are removed in the washing steps 	<ul style="list-style-type: none"> • Lower throughput: • Heterogeneous. Washes are needed: labour intensive • Transfer step: iRBCs transfer to streptavidin plates is required after treatment. Time consuming. • More sources of assay variability • 384-well plates

The first component evaluated was the biotin-TUBEs, which were titrated-fixing concentrations for primary and secondary antibodies at 1:200 in absence or presence of saturating concentration of proteins from isolated *P. falciparum* cell extracts (10 µg). BSA (0.1%) was also added to the antibody solutions to decrease the non-specific binding. Saturation of the streptavidin-coated well was reached at 30 ng of biotin-TUBEs. This amount of biotin-TUBEs was used in subsequent experiments as concentrations higher than 60 ng produced a decrease in the signal

which was specific and dependent. Signal was specific and dependent on the presence of TUBEs and ubiquitylated proteins because no changes in signal were observed in the absence of cell extracts (Figure 4.4A). In order to determine the optimal dilution of primary and secondary antibodies, they were crosstitrated using three different dilutions.

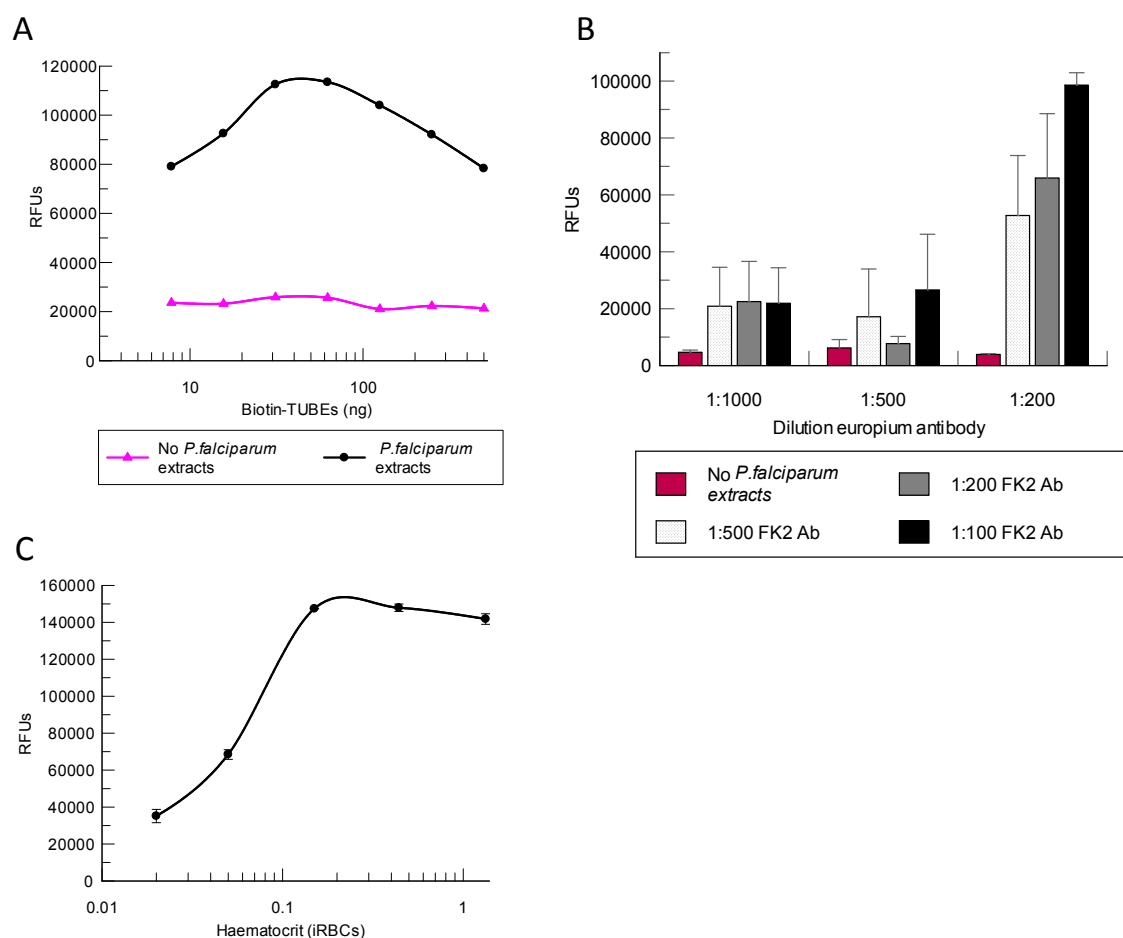


Figure 4. 4. Optimization of the components of the TUBE-DELFI assay. X axis of panels A and C are represented in logarithmic scale. **A)** Titration of TUBEs with saturating concentration of proteins from isolated *P. falciparum* cell extracts (10 µg), using anti-ubiquitin FK2 and europium antibodies at 1:200 dilution. **B)** TUBE-DELFI assay using a saturating concentration of proteins from isolated *P. falciparum* cell extracts (10 µg), 30 ng TUBEs and three different concentrations of anti-ubiquitin FK2 and secondary europium antibodies. A control without proteins was used to determine the background signal. **C)** Haematocrit titration of iRBCs with schizonts at 100% parasitaemia treated with MG132 inhibitor (1.5 µM), using the conditions previously established (30 ng TUBEs, 1:100 FK2 and 1:200 europium antibodies).

The assay was also performed in the absence of *P. falciparum* proteins to estimate the background signal. Dilutions 1:200 of europium antibody and 1:100 of FK2 primary antibody were chosen for further set up experiments as they produced the highest signal to background ratio (Figure 4.4B). Once TUBEs and antibody dilutions were optimized, the haematocrit of the culture that displayed the maximum signal was established by testing different amounts of *P. falciparum* iRBCs at 100% parasitaemia (Figure 4.4C). Cultures at different haematocrits were treated for 1 hr with the proteasome inhibitor MG132 (1.5 μ M) to allow the maximal accumulation of ubiquitylated proteins and saturation of TUBEs. Treatment was performed in another plate to avoid interferences with the streptavidin-coated plates. After the incubation with the inhibitor, iRBCs were transferred to the streptavidin plate previously coated with biotin-TUBEs. Maximal signal was observed with 0.2% haematocrit. Concentrations above 0.2% did not produce changes in the signal because of saturation of the TUBE binding sites.

3.4. Pharmacological validation of AlphaLISA and DELFIA assays using known proteasome inhibitors

Assays developed in HTS format for drug discovery should first be validated for biological and pharmacological relevance but also for assay performance. Seven different proteasome inhibitors, known to inhibit the growth of *P. falciparum* cells [14], were tested at different concentrations in both assays to verify that they produced an accumulation of ubiquitylated proteins and that the assays were sensitive enough to detect this increment in a robust manner. iRBCs with *P. falciparum* schizonts at 100% parasitaemia were obtained as described in Methods and treated for 1 hr with compounds. Dose-response experiments were performed starting at different concentrations according to the reported IC₅₀ of each compound [14]. For representation purposes, compound effects have been normalized between 0 and 100% inhibition, the maximum (100%) being the highest amount of accumulated ubiquitylated proteins for each inhibitor and the minimum (0%) being the basal level of ubiquitylated proteins without inhibitor (Figure 4.5A).

Proteasome inhibition caused by the compounds tested, led to an accumulation of *P. falciparum* ubiquitylated proteins in a dose-dependent manner. Bell effect was observed with some compounds at the highest concentrations tested, but it was not related with the saturation of the assay components (Hook effect) as it was observed at different levels of maximum response. This effect could be due to the biological mode of action of the compound. Point of curve showing this effect was not included in the IC₅₀ fitting. Assays with uRBCs at the same haematocrit were performed in parallel to confirm that observed changes in ubiquitylated protein levels occurred in the parasite and not in the host. No significant changes were observed in the presence of proteasome inhibitors, as the host proteasome is not very active.

The intrinsic variability of the assay is reflected in the different maximal responses obtained with these tool compounds in different replicates that correspond to different days (Table 4.2), although this fact did not affect the pIC₅₀ values (Figure 4.5B). Maximum stimulation reached for each compound was in the range of 1.3-2.7-fold (Table 4.2) regarding basal levels. Factors contributing to this intrinsic variability could be due to synchronization and purification steps of the cells as well as the parasite biology. Results also indicate that a compound with a pIC₅₀ between 5.6-8.2 in whole cell, acting upon the UPS, can be picked up with these two assays.

The correlation of pIC₅₀s from both assays is shown in Figure 4.5B. pIC₅₀ is the negative logarithm of the concentration in molar units that produces the 50% of the biological response ($\text{pIC}_{50} = -\log [\text{IC}_{50}]$), in this case, the increase of ubiquitylated proteins. The inter-assay accuracy, which is the measure of the deviation of the assay average from one assay to the other under perfect match conditions, as well as the precision (Pearson's correlation), was estimated for each assay. Thus, the concordance correlation coefficient (CCC) that takes into account both parameters ($\text{CCC} = \text{interassay precision} \times \text{interassay accuracy}$) was calculated for DELFIA vs AlphaLISA assays, obtaining a value of 0.93, which means that the match between both assays is perfect. Assays with values of CCC greater than 0.81 are considered identical (perfect match) as CCC is the product of two correlation values.

Table 4. 2. pIC50 and maximum percentage of stimulation of proteasome inhibitors in different assays

Proteasome inhibitor	pIC50 reported whole cell	pIC50 AlphaLISA (n = 4)	Maximum% stimulation AlphaLISA	pIC50 DELFIA (n = 4)	Maximum% stimulation DELFIA
Epoxomicin	8.17	7.64 ± 0.09	178 ± 47	7.74 ± 0.24	177 ± 15
Bortezomib	7.05	7.95 ± 0.08	178 ± 24	8.16 ± 0.05	180 ± 14
Gliotoxin	5.66	5.88 ± 0.73	217 ± 53	6.12 ± 0.27	180 ± 26
MG132	7.65	7.17 ± 0.04	236 ± 36	7.41 ± 0.21	189 ± 55
MG115	7.01	6.88 ± 0.09	208 ± 22	6.92 ± 0.21	185 ± 17
Lactacystin	5.83	5.81 ± 0.07	217 ± 27	6.06 ± 0.22	193 ± 32
Clasto-Lactacystin β lactone	5.83	6.30 ± 0.09	195 ± 19	6.48 ± 0.18	198 ± 17

pIC50 average of the compounds in both assays was also compared with the reported pIC50 that led to the parasite growth inhibition in the whole cell assay [14] (Figure 4.5C and Table 4.2). The pIC50 of Bortezomib in whole-cell assay is the average of the pIC50 previously reported [13,14] as both published data differ in 0.91 log units. The CCC obtained was 0.82, which is a perfect match even when pIC50s were obtained with one hour of compound incubation, while the whole-cell assay requires at least 48 hours of incubation (Figure 4.5C). These results strongly suggest that the UPS is the primary target of these compounds and that the parasite death is due to its deregulation. It confirms the relevance of the UPS as a drug target for malaria treatment and also validates these AlphaLISA and DELFIA assays to detect UPS inhibitors in HTS conditions.

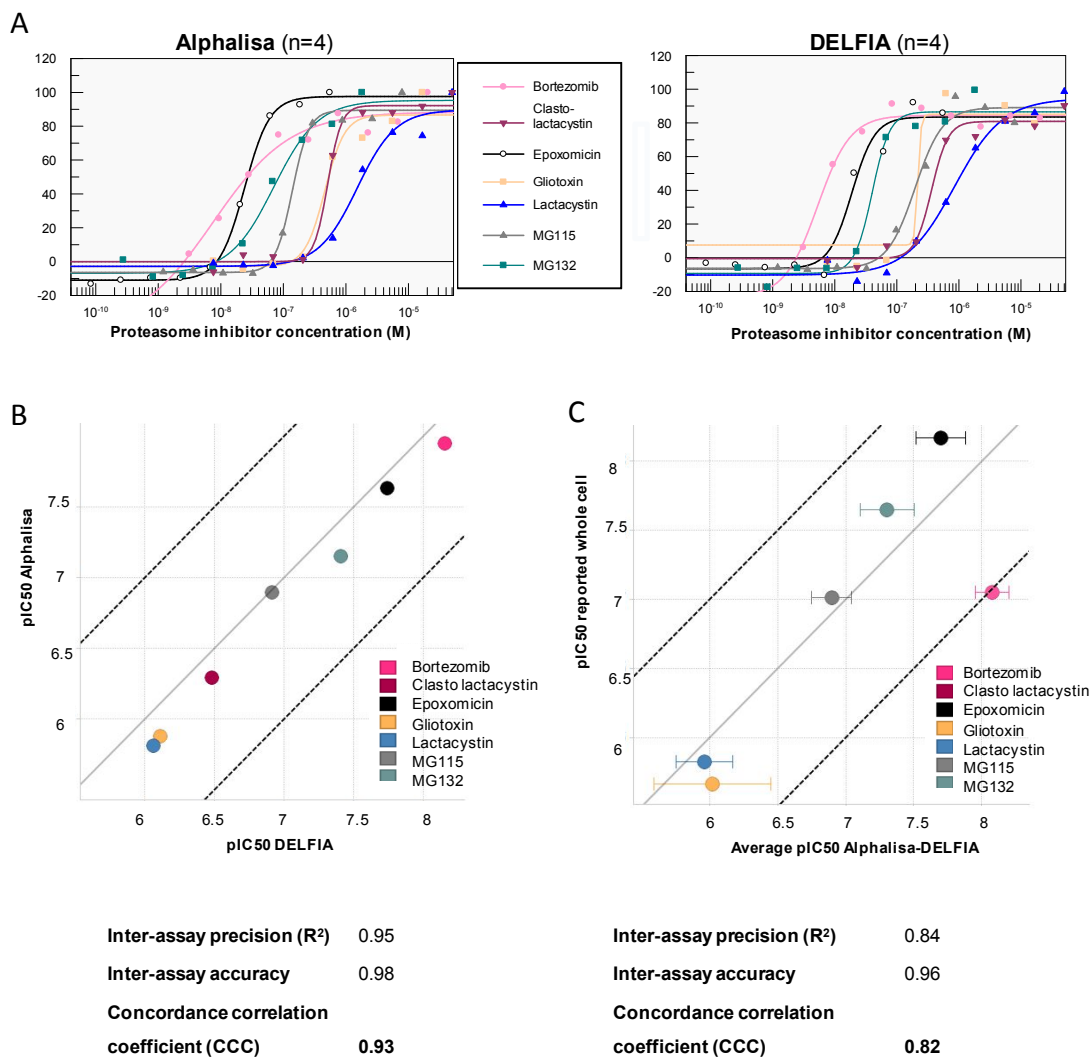


Figure 4. 5. Correlation between AlphaLISA and DELFIA assays. **A)** Dose–response curves of known proteasome inhibitors in TUBE-AlphaLISA (left panel) and TUBE-DELFA assays (right panel). The response is represented as a percentage of inhibition, which is calculated normalizing the data to the maximal signal obtained for each compound (see data analysis section). **B)** Correlation of pIC50s in TUBE-AlphaLISA and TUBE-DELFA assays (average of at least 2 copies). Each point corresponds to a particular proteasome inhibitor. Interassay accuracy, Pearson’s correlation and CCC (the multiplication of both values) are shown. Grey line represents perfect correlation ($y = x$) while black dotted lines are the perfect correlation ± 1 log unit ($y = x \pm 1$). **C)** Correlation of the average of pIC50 obtained in the AlphaLISA and DELFIA assays vs reported pIC50 that produce the parasite growth inhibition in the whole cell assay.

3.5. Assay robustness

The suitability of both assays to carry out HTS campaigns was determined with previously tested proteasome inhibitors scattered in known positions within the plates (spike plates) to simulate a real HTS compound plate. They were placed at four different concentrations: a) the maximum concentration of each curve in dose response assays (Figure 4.5A), b) three times the reported IC₅₀ (whole cell), c) the reported IC₅₀ (whole cell), and, d) a non-inhibitory concentration. In Figure 4.6A, size of the points for each compound is proportional to the concentration tested (see embedded Table). Bigger symbols indicate higher concentrations. The level of ubiquitylated proteins present in *P. falciparum* iRBCs with schizonts was calculated as a percentage of stimulation compared with ubiquitylated protein basal levels (control 1 without any treatment), which corresponds to 100% of stimulation. A positive control of stimulation (control 2) using two known proteasome inhibitors, MG132 (1.5 μ M) or Lactacystin (15 μ M), was also included for internal reference. Both caused similar stimulation levels (calculated as an average of all points with either of these two inhibitors). Compounds whose response was above the statistical cut-off (calculated as the average of the control 1 population plus three times the standard deviation), which is around 30%, were considered as positive in the assays. Some compounds showed the previously mentioned bell effect, such as Gliotoxin and Lactacystin in DELFIA assay, and also Clasto-Lactacystin- β -lactone and MG132 in AlphaLISA assay (Figure 4.6A). Despite that, results indicate that it is possible to find inhibitors in a screening plate tested at 10 μ M with either assay, as the percentage of stimulation of all the compounds is above the statistical cut-off at that concentration.

Percentage of stimulation of iRBCs treated with the proteasome inhibitor MG132 or Lactacystin (control 2) as well as of iRBCs without treatment (control 1), is represented in Figure 4.6B. These results were obtained from 96 different wells for each control and show that the robustness of the assays' performance making them suitable for screening campaigns. In Figure 4.6C bars represent the robust average of control 1 (basal levels of ubiquitylated proteins, no treatment), control 2 (cells treated with MG132 or Lactacystin) and a control without *P. falciparum* cell lysates in both assays. Control 1 was 100% of stimulation while control 2 was

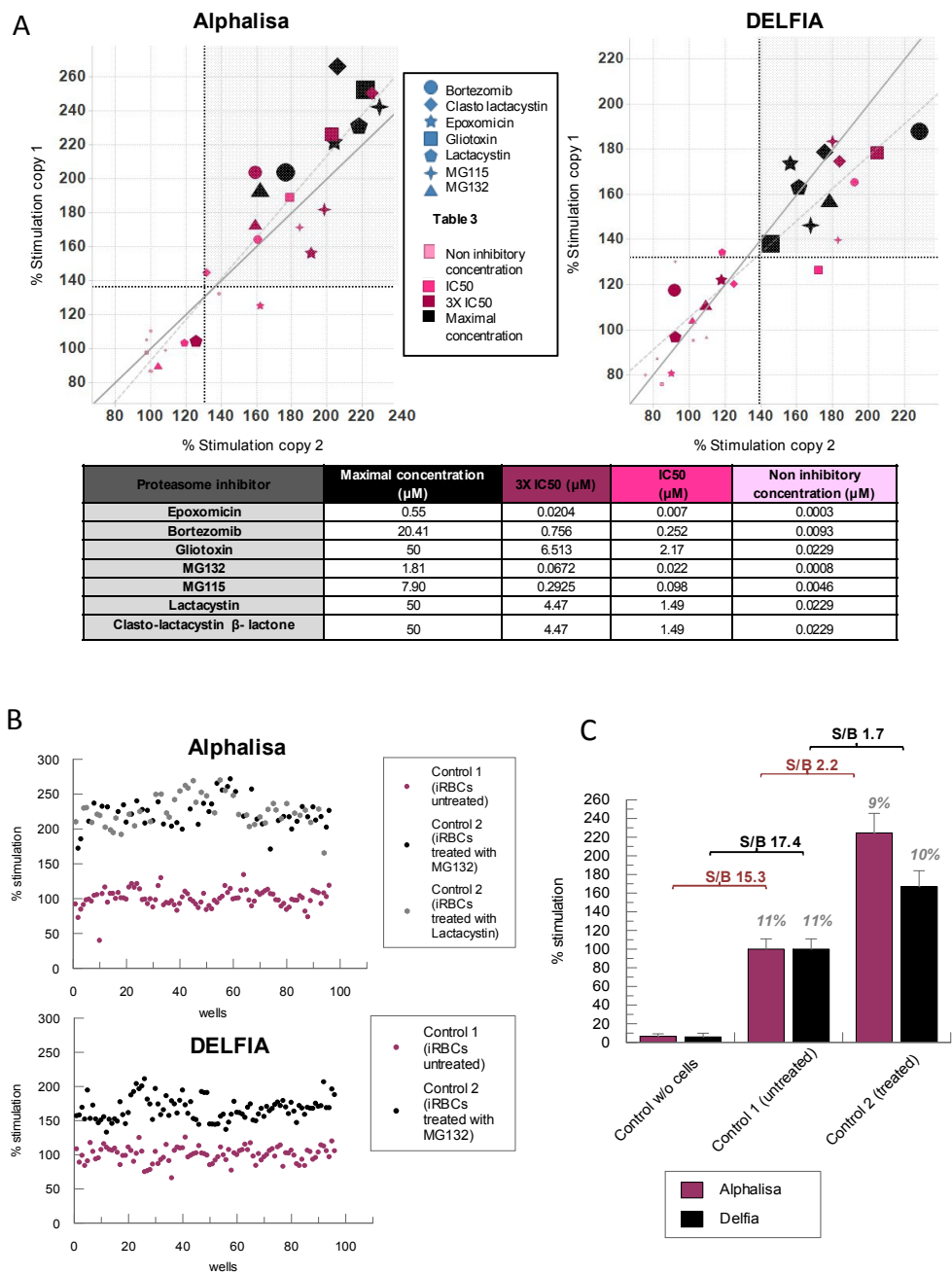


Figure 4. 6. Assay robustness and validation. **A)** Correlation of two plates with proteasome inhibitors located in known positions at four different concentrations simulating a screening plate (see embedded Table). Response produced by proteasome inhibitors on the levels of ubiquitylated proteins represented as % of stimulation (% of stimulation = 100*(sample/average control 1). The size of the points is proportional to the compound concentration tested. Light grey is the linear regression of the data while dark grey is the perfect correlation (y = x). Black dotted lines represent the statistical cut-off of each replicate (average control 1 + 3*standard deviation). Positive hits are above the cut off. **B)** Graph of control 1 (iRBCs without treatment), and control 2 (iRBCs with proteasome inhibitor 1.5 μM MG132 or 15 μM Lactacystin) in the screening plates (n = 96 wells) represented as % of stimulation. **C)** Comparison of AlphaLISA (purple) and DELFIA (black) assay control data: robust average in bars, robust CV in italics and S/B in bold for control 1, control 2 and control without lysates in both assays.

around 220% in AlphaLISA and 170% in DELFIA assay. Robust coefficient of variation (CV), which is calculated with the formula $CV = 100 * (\text{robust standard deviation} / \text{robust average})$, was similar in both assays. CV values were below 15% in both cases, which is the maximum permissible limit to consider a stimulation assay robust. Due to the low signal to background obtained with these tool compounds and the maximal asymptote variability, it is recommended not to use the control 2 to normalize the data in a HTS campaign, but to include it as a positive control of stimulation in all the plates. Signal-to-background ratio (S/B) between basal levels of ubiquitylated proteins and the signal obtained without cell extracts was 15.3 and 17.4 in AlphaLISA and DELFIA, respectively. Altogether these results confirm that both assays are able to differentiate levels of ubiquitylated proteins and that the small window between control 1 and control 2 is due to small differences of total ubiquitylated proteins in the presence of proteasome inhibitors (Figure 4.1C). Despite that, a screening campaign with both assays is ongoing and reproducible results are being obtained.

4. DISCUSSION

After phenotypic screening efforts in the malaria field, many inhibitors have been found with good *in vitro* potencies in growth inhibition assays [31-33]. The mode of action of all these hits is unknown. Assays able to disclose the target or, at least, the pathway they are hitting are urgently needed to focus on novel mechanisms of action to overcome emerging resistance. For this reason, two universal assays have been developed that are based on AlphaLISA and DELFIA technologies, coupled to TUBEs traps, to identify compounds that modify the activity of the UPS within the cell, as no current anti-malarial treatment is targeting this pathway. These assays are based on the accumulation of ubiquitylated proteins after compound treatments, making them ideal for broad applications. The assays could also be applied to a large diversity of cell lines and pathologies, in which the UPS plays an essential role, such as cancer, inflammatory diseases, etc.

Working with 1,536-well plates and RBCs had two added challenges in the development of the assays. First, no lysis procedure was previously published in

this type of plate, so a new protocol was set up for this critical step. And, the second challenge was the presence of haemoglobin from the RBC, as its presence interfered with AlphaLISA assay. Despite this, the S/B with regard to the sample without RBCs was around 15-fold in AlphaLISA assay. This S/B is very similar to that obtained in DELFIA, where no haemoglobin is present during the read-out, as it is fully washed away. Both assay formats have been able to detect changes in the levels of ubiquitylated proteins in presence of different proteasome inhibitors, obtaining pIC50s that perfectly correlate with the known pIC50 that cause parasite growth inhibition [14]. A short incubation time of just one hour in the assays, allows the conclusion that UPS is the primary target of the tested compounds, the UPS deregulation being the principal cause of the parasite death.

These AlphaLISA and DELFIA assays can be used in HTS assay conditions as known proteasome inhibitors located in random positions in a screening plate have been detected at different concentrations, all of them being above the statistical cut-off at 10 μ M. Moreover, the CV of the control was lower than 15% showing their robustness. AlphaLISA is a more suitable assay to perform HTS of large compound collections as it has been adapted to 1,536-well plate format, while DELFIA assay would be more useful as an orthogonal assay to confirm, in dose response, primary hits detected in AlphaLISA assay. Source of interferences in DELFIA are much lower than in AlphaLISA because unbound reagents are removed after washes and compounds are not present during the binding of the different components. Nonetheless, if a small number of compounds are screened, TUBE-DELFIA assay can be used as the primary option.

Since total ubiquitylation is assessed from living cells cultured *in vitro* in both assays, all kinds of cell-penetrating UPS inhibitors or activators that affect ubiquitylated proteins levels within the cell could be detected. The most obvious compounds could be those having an effect on the proteasomal activity as it controls a higher number of ubiquitylated proteins than other components of the UPS. Compounds affecting DUBs or E3 ligases with a broad spectrum of substrate proteins could also be identified, being a promising source of selective compounds [12] However, the majority of E3 ligases and DUBs exhibit substrate specificity making it more difficult to identify compounds that affect the levels of

ubiquitylation of a small number of proteins with the assays described. To discover the precise target, biochemical assays are commercially available for testing proteasome or DUBs inhibition.

The beauty of this approach is that extensive previous knowledge about the target pathway is not required to find inhibitors, as compounds blocking any step of the UPS that produce a significant variation in the pool of ubiquitylated proteins can be found. The target deconvolution of the compounds obtained through this approach could also lead to identify new druggable targets within the UPS.

5. CONCLUSION

AlphaLISA and DELFIA assays developed here can be considered as universal systems to assess changes in the total ubiquitylated protein levels and could be adapted to detect specific ubiquitylated proteins just by changing the primary antibody. Here, whole ubiquitilome changes in *P. falciparum* have been measured using TUBEs and anti-ubiquitin FK2 antibody, but this antibody could be changed for any other against the protein of interest. Thus, activity of a specific DUB or ligase can be assayed in HTS campaigns in whole cells and under native conditions without using recombinant proteins or engineered cells. Applications using these assays can be numerous, not being necessarily related with compound identification, but with the biology of a certain process or protein. The quantification of the levels of the specific components or the whole UPS can also be useful to investigate the molecular basis of different diseases as they can be adapted to study any other pathology in which the UPS plays an essential role, using different cell lines and/or to measure a specific activity of some of the components of the UPS in a high throughput format.

ABBREVIATIONS

UPS: Ubiquitin proteasome system
DUB: Deubiquitylase
DUBI: DUB inhibitor
TUBEs: Tandem ubiquitin binding entities
UBA: Ubiquitin-associated domains
IRBCs: *P. falciparum*-infected red blood cells
URBCs: Uninfected red blood cells
PHGH: Peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing
HTS: High-throughput screening
GST: Glutathione S-transferase
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
S/B: Signal to background
CV: Coefficient of variation
PMSF: Phenylmethanesulphonyl fluoride
DTT: Dithiothreitol
GSH: Glutathione acceptor beads
BSA: Bovine serum albumin
TR-FRET: Time-resolved fluorescence resonance energy transfer
DELFA: Dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay
ECL: Enhanced chemiluminescence
PBS: Phosphate buffer solution
PVDF: Polyvinylidene difluoride
CCC: Concordance correlation coefficient

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nitin Jindal for proofreading the manuscript and Imanol Peña, Ana Roa, Javier Gamo and Fernando Ramón for their helpful discussions. This work was supported MINECO-Spain grant BFU2011-28536 (MSR) and Diputación Foral de Gipuzkoa (MSR and FA). LMC was supported with a fellowship of Inbiomed foundation.

REFERENCES

- [1] Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochem Biophys Acta*. 1843, 2014:13–25.
- [2] Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 2009, 37:937–53. doi: 10.1042/BST0370937.
- [3] Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function for the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*. 2010, 20:391–401. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.007.
- [4] Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*. 2001, 8:739–58. doi: 10.1016/S1074-5521(01)00056-4.
- [5] Kisselev AF, Van der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol*. 2012, 19:99–115. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.01.003.
- [6] Xolalpa W, Perez-Galan P, Rodriguez MS, Roue G. Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Curr Pharm Des*. 2013, 19:4053–93. doi: 10.2174/1381612811319220014.
- [7] Mata-Cantero L, Lobato-Gil S, Aillet F, Lang V, Rodriguez MS. The ubiquitin-proteasome system (UPS) as a cancer drug target: emerging mechanisms and therapeutics. 2014. pp. 223–63.
- [8] Aminake MN, Arndt HD, Pradel G. The proteasome of malaria parasites: A multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention? *Int J Parasitol*. 2012, 2:1–10.
- [9] Ponts N, Saraf A, Chung DWD, Harris A, Prudhomme J, Washburn MP, et al. Unravelling the human malaria parasite's ubiquitome. *J Biol Chem*. 2011, 286:40320–30. doi: 10.1074/jbc.M111.238790.
- [10] Li H, Ponder EL, Verdoes M, Asbjornsdottir KH, Deu E, Edgington LE, et al. Validation of the proteasome as a therapeutic target in *Plasmodium* using an epoxiketone inhibitor with parasite-specific toxicity. *Chem Biol*. 2012, 19:1535–45. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.09.019.
- [11] Li H, van der Linden WA, Verdoes M, Florea BI, McAllister FE, Govindaswamy K, et al. Assessing subunit dependency of the *Plasmodium* proteasome using small molecule inhibitors and active site probes. *ACS Chem Biol*. 2014, 9:1869–76. doi: 10.1021/cb5001263.
- [12] Hamilton MJ, Lee M, Le Roch KG. The ubiquitin system: an essential component to unlocking the secrets of malaria parasite biology. *Mol Biosyst*. 2014, 10:715–23. doi: 10.1039/c3mb70506d.
- [13] Reynolds JM, El Bissati K, Brandenburg J, Günzl A, Mamoun CB. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor Bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol*. 2007, 7:13. doi: 10.1186/1472-6904-7-13.
- [14] Kreidenweiss A, Kremsner PG, Mordmüller G. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malar J*. 2008, 7:187. doi: 10.1186/1475-2875-7-187.
- [15] Gantt SM, Myung JM, Briones MRS, Li WD, Corey EJ, Omura S, et al. Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998, 42:2731–8.
- [16] Chung DWD, Le Roch KG. Targeting the *Plasmodium* ubiquitin/proteasome system with anti-malarial compounds: promises for the future. *Infect Disord Drug Targets*. 2010, 10:158–64. doi: 10.2174/187152610791163345.
- [17] Melvin AT, Woss GS, Park JH, Waters ML, Allbritton NL. Measuring activity in the ubiquitin-proteasome system: from large scale discoveries to single cells analysis. *Cell Biochem Biophys*. 2013, 67:75–89. doi: 10.1007/s12013-013-9621-9.
- [18] Liggett A, Crawford LJ, Walker B, Morris TCM, Irvine AE. Methods for measuring proteasome activity: Current limitations and future developments. *Leuk Res*. 2010, 34:1403–9. doi: 10.1016/j.leukres.2010.07.003.

- [19] Stein ML, Groll M. Applied techniques for mining natural proteasome inhibitors. *Biochem Biophys Acta*. 1843, 2014:26–38.
- [20] Kisselev A, Goldberg A, Deshaies R. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasome with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol*. 2005, 398:364–78.
- [21] Hoyt M, Zhang M, Coffino P, Deshaies R. Probing the ubiquitin/proteasome system with ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Methods Enzymol*. 2005, 398:399–413.
- [22] Figueiredo-Pereira ME, Berg KA, Wilk S. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem*. 1994, 63:1578–81. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63041578.x.
- [23] Marblestone JG, La Rocque JP, Mattern MR, Leach CA. Analysis of ubiquitin E3 ligase activity using selective polyubiquitin binding proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1823, 2012:2094–7.
- [24] Schneider S, Chen H, Tang J, Emkey R, Andrews PS. Development of a homogeneous AlphaLISA ubiquitination assay using ubiquitin binding matrices as universal components for the detection of ubiquitylated proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1823, 2012:2038–45.
- [25] Hjerpe R, Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Lang V, England P, Rodríguez MS. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep*. 2009, 10:1250–8. doi: 10.1038/embor.2009.192.
- [26] Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Hjerpe R, Torres-Ramos M, Lang V, Rodríguez MS. Isolation of ubiquitylated proteins using Tandem Ubiquitin- Binding Entities (TUBEs) *Methods Mol Biol*. 2012, 832:173–83.
- [27] Lopitz-Otsoa F, Rodríguez-Suarez E, Aillet F, Casado-Vela J, Lang V, Matthiesen R, et al. Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities. *J Proteomics*. 2012, 75:2998–3014. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.001.
- [28] Research and Reference Reagent Resource Center (MR4). <http://www.mr4.org>.
- [29] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976, 13:673–5. doi: 10.1126/science.781840.
- [30] Mata-Cantero L, La Fuente MJ, Sanz L, Rodríguez MS. Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. *Malar J*. 2014, 13:112. doi: 10.1186/1475-2875-13-112.
- [31] Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, De Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*. 2010, 465:305–10. doi: 10.1038/nature09107.
- [32] Guiguemde WA, Shelat AA, Bouck D, Duffy S, Crowther GJ, Davis PH, et al. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2010, 465:11–315. doi: 10.1038/nature09099.
- [33] Plouffe D, Brinker A, McNamara C, Henson K, Kato N, Kuhen K, et al. In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarial discovered in a high throughput screen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008, 105:9059–64. doi: 10.1073/pnas.0802982105.

5. Discusión general

5. DISCUSIÓN GENERAL

La aportación fundamental del trabajo presentado ha sido el desarrollo de una serie de herramientas que permiten estudiar el UPS del parásito, a lo largo de su ciclo intraeritrocítico, y su hospedador durante la infección, así como identificar compuestos que alteren la homeostasis del sistema, mediante la cuantificación de la cantidad total de proteínas ubiquitinadas. Para ello ha sido necesario superar una serie de obstáculos técnicos, como la presencia de hemoglobina, y el desarrollo de un nuevo método de cultivo, que permite obtener suficiente cantidad de proteínas ubiquitinadas de eritrocitos infectados, para poder ver diferencias con respecto a eritrocitos no infectados tras su identificación por MS.

5.1. CAPÍTULO 1. Establecimiento de un cultivo *in vitro* sincrónico a alta parasitemia.

La necesidad del descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas ha llevado a que durante las últimas décadas se hayan realizado grandes esfuerzos para el desarrollo de cultivos *in vitro* de *P. falciparum* en su estadio intraeritrocítico, por ser la etapa más relacionada con su patogénesis. En 1976 se publicó por primera vez las condiciones y factores necesarios para obtener un cultivo continuo del parásito en su etapa intraeritrocítica (Trager and Jensen, 1976). La posibilidad de tener un cultivo *in vitro* de *P. falciparum* ha permitido grandes avances en el campo de la malaria durante los últimos 30 años. Aunque algunas condiciones del cultivo han sido mejoradas para incrementar el crecimiento, la reproducibilidad y abaratar costes, las condiciones del cultivo continúan siendo esencialmente las mismas.

El hematocrito estándar utilizado para el cultivo de *P. falciparum*, suele variar entre 2%-5%. El crecimiento del cultivo a un hematocrito mayor da lugar a una disminución de su viabilidad, por aumentar el estrés del parásito (Jensen, 2002). Su mantenimiento requiere de un reemplazo del medio frecuente, debido al alto metabolismo del parásito y a la acumulación de productos metabólicos. A bajas

parasitemias es posible realizar un cambio de medio cada 2-3 días sin que la viabilidad del parásito se vea afectada. Para reducir el estrés, y por tanto alcanzar unas parasitemias mayores, el medio puede ser reemplazado diariamente e incluso realizar varios cambios de medio diarios. A pesar de ello, obtener parasitemias mayores del 10% continúa siendo complicado, puesto que requiere de un gran número de recursos y tiempo. La regulación del crecimiento del parásito parece estar relacionada por un lado con el incremento del pH y ácido láctico en el medio debido a su metabolismo (Zolg et al., 1984), y por otro lado con la producción de moléculas señalizadoras del parásito, que regulan la densidad de su población (Dyer and Day, 2003). Esto concuerda con la necesidad de un aumento en el número de cambios de medio para poder incrementar el número de células infectadas en el cultivo.

Para estudios de proteómica o genómica con componentes del parásito, la limitación de la parasitemia puede verse compensada con el crecimiento de un mayor volumen de cultivo. En estos casos, tras recoger el cultivo se realiza un tratamiento con un detergente, la saponina, que produce la ruptura selectiva de los eritrocitos, obteniendo parásitos libres que son lisados a posteriori. Sin embargo, esto no es posible en los estudio de los componentes del hospedador durante la infección, ya que se hace necesario partir de muestras con un alto porcentaje de infección para poder hacer un análisis comparativo, reduciendo las interferencias de otras proteínas provenientes de los eritrocitos no infectados.

Uno de los objetivos de este trabajo era el estudio del ubiquitoma del parásito y del hospedador a lo largo de las diferentes etapas intraeritrocíticas, con el fin de estudiar la implicación del UPS en los sistemas de intercomunicación entre ambos. Ello conlleva no solo tener un cultivo con un alto número de eritrocitos infectados, sino también trabajar con cultivos sincrónicos que permitan estudiar cambios a lo largo del ciclo. Esto lo complica aún más, puesto que cualquier método de sincronía implica la pérdida de células infectadas con otras etapas del parásito.

Los métodos disponibles para obtener cultivos con altas parasitemias están basados en el cambio frecuente del medio de cultivo y en su dilución (Raventos-Suarez, 1985; Radfar et al., 2009). Para ello el cultivo se debe mantener durante una o dos semanas diluyendo el hematocrito de manera secuencial, o

manteniéndolo lo suficientemente bajo para evitar el estrés. Además, para que el cultivo sea sincrónico, dependiendo del grado de sincronía necesaria, se debe realizar al menos un tratamiento de sincronización, por ejemplo con sorbitol o percoll. El problema fundamental de estos protocolos son las constantes atenciones que requieren los cultivos hasta alcanzar parasitemias de entre 40 y 60%, lo que hace muy difícil su escalado para por ejemplo experimentos de proteómica. En nuestro caso además, para estudiar el ubiquitoma era necesario partir de una gran cantidad de cultivo sincrónico a alta parasitemia, puesto que la cantidad de proteínas ubiquitinadas en la célula en condiciones fisiológicas no es muy alta.

Antes de establecer el nuevo protocolo descrito en este trabajo, se intentó obtener altas parasitemias aplicando los escasos métodos descritos. El cultivo fue sincronizado con sorbitol, y el medio reemplazado diariamente durante al menos una semana, a un hematocrito que variaba entre 0.2 y 0.4%. Si bien es cierto que llegamos a obtener parasitemias altas de alrededor del 40%, esto no se daba de manera reproducible en nuestras condiciones de trabajo, sino que en ocasiones se estresaban no llegando a invadir lo suficiente y por tanto no alcanzando dichos valores. Además, en todos los casos los cultivos perdían la sincronía. Quizá ello se deba a diferencias en la cepa o a la sangre utilizada para el mantenimiento del parásito. Se ha reportado que la parasitemia obtenida se ve seriamente mermada cuando el parásito crece en eritrocitos con más de dos semanas de antigüedad (Radfar et al., 2009). En nuestras condiciones de trabajo esto no siempre puede asegurarse.

Por ello los primeros esfuerzos de este trabajo fueron dedicados al establecimiento de un nuevo protocolo sencillo y rápido que combinase diferentes técnicas ya descritas, como la sincronización con tratamientos de percoll/sorbitol, la purificación por columnas magnéticas y la reducción del hematocrito para incrementar los ratios de invasión.

La primera parte de sincronización establecida es muy similar a la descrita por *Rafdar et al*, ya que obtenían una ventana de sincronización muy corta de alrededor de 4 horas (diferencia de horas entre la fase más tardía y más temprana en un cultivo). El sorbitol es una de las técnicas más utilizadas en los laboratorios

de investigación de malaria. Es una técnica sencilla basada en la diferencia de permeabilidad que poseen los eritrocitos infectados con fases maduras o con anillos, frente a iones y azúcar. Los eritrocitos infectados con trofozoitos y esquizontes maduros poseen una mayor permeabilidad, produciéndose por tanto una lisis hipotónica y enriqueciendo el cultivo con eritrocitos infectados en anillos o fases muy tempranas de trofozoitos. El tratamiento con sorbitol produce normalmente una ventana de sincronización de 18 horas, haciendo necesario posteriormente otro ciclo de sincronización, especialmente en cultivos a alta parasitemia. Sin embargo, tratamientos consecutivos con sorbitol pueden producir daño por estrés osmótico en los eritrocitos, disminuyendo la viabilidad y por tanto la invasión (Krugliak and Ginsburg, 2006; Jensen, 2002).

Por ello, el tratamiento con sorbitol es alternado con un tratamiento con percoll (Figura 1.4). Este tratamiento está basado en la diferencia de densidad entre los eritrocitos infectados con fases maduras del parásito o con fases tempranas. Los eritrocitos infectados con trofozoitos maduros y esquizontes poseen menor densidad, debido a que en su superficie existen unas protrusiones electro-densas, llamadas *Knobs*, y a un incremento en su permeabilidad, lo que permite que puedan ser separados de eritrocitos no infectados o infectados con anillos. Además, la presencia de sorbitol en estos gradientes ayuda a dicha separación, ya que el incremento de permeabilidad hace que los eritrocitos infectados con fases maduras absorban una mayor cantidad de sorbitol y aumenten su tamaño por la entrada de agua (Lambros and Vanderberg, 1979).

La ventana de sincronización obtenida con el percoll es menor que con el sorbitol, ya que existe una menor diferencia de horas entre trofozoitos maduros y esquizontes, que entre las diferentes fases del estadio de anillo. Sin embargo, la primera sincronización con sorbitol favorece que se produzca una mayor sincronización con el percoll. Por otro lado, se ha visto que la invasión de los eritrocitos se ve incrementada tras el gradiente de percoll, favoreciendo un incremento en la parasitemia (Spadafora et al., 2011). Ello puede deberse entre otras cosas, a que la purificación de eritrocitos infectados con formas maduras permite una completa renovación de los eritrocitos presentes en el cultivo, los cuales son reemplazados por eritrocitos frescos.

En el protocolo previamente descrito por *Radfar et al.* (Radfar et al., 2009) para obtener una ventana de sincronización tan corta, además de los tratamientos de sorbitol y percoll, se partía de viales congelados del cultivo. Dichos viales estaban sincrónicos en anillos, ya que durante el proceso de congelación se produce la lisis de los eritrocitos infectados con formas maduras (Inger Ljungström 2004). En nuestro caso, en el protocolo se ha introducido un tercer ciclo de sincronización por columnas magnéticas, para no tener que partir de cultivos congelados (Figura 1.1). Esto hace que el proceso de obtención de cultivos a alta parasitemia sea más rápido, ya que se ha descrito que tras la descongelación la cepa requiere de al menos una semana de adaptación para estar a pleno rendimiento, por tener disminuida su tasa de multiplicación (Flores et al., 1997).

La sincronización por columnas magnéticas permite purificar eritrocitos infectados en formas maduras, ya que éstos poseen una mayor cantidad de hemozoina. La sincronización previa con sorbitol y percoll favorece notablemente dicha purificación, llegando a obtener cultivos de eritrocitos infectados de una pureza de casi el 98% (Figura 1.1). Estos cultivos sincrónicos pueden ser utilizados para múltiples ensayos bioquímicos como el descrito en el capítulo 3. Por otro lado, la ventaja fundamental de añadir el paso de purificación por columna magnéticas al protocolo, fue la obtención de cultivos a alta parasitemia, sin necesidad de múltiples cambios de medio y de mantener grandes volúmenes de cultivo a bajo hematocrito durante días. Se ha descrito que la viabilidad y la morfología de los parásitos y eritrocitos no se ven afectados tras el paso por las columnas, y que además la invasión que tiene lugar tras la adición de nuevos eritrocitos sin infectar es mayor y más reproducible que la producida tras el tratamiento con percoll (Bates et al., 2010; Karl et al., 2010). La combinación de la purificación magnética con la reducción del hematocrito (0.2%) (Figura 1.2) fueron las claves para obtener en tan solo un día cultivos con una parasitemia de alrededor del 40%, a partir de una parasitemia inicial del 10% (Figura 1.3), permitiendo recoger el cultivo en cualquier etapa intraeritrocítica y hacer comparativas del proteoma a lo largo de la infección.

Tal y como se había reportado previamente, la capacidad invasiva del merozoito se vio afectada por el hematocrito, obteniéndose unos niveles máximos

de invasión de alrededor de 4 al hematocrito más bajo testado (0.2%) (Figura 1.2). También se confirmó un incremento del ratio de invasión tras la purificación magnética (Bates et al., 2010; Spadafora et al., 2011). Esto podría deberse a la eliminación del ácido láctico y las moléculas señalizadoras del parásito presentes en el medio en el momento de la purificación, así como al reemplazo de los eritrocitos sin infectar por eritrocitos frescos, ya que todo ello tiene una influencia sobre la tasa de multiplicación del parásito. El efecto de la cantidad de parásito en los ratios de invasión también fue confirmado, puesto que cuánto menor cantidad de parásito estaba presente en el cultivo (menor parasitemia inicial), mayores ratios de invasión eran obtenidos (Figura 1.3).

En cuanto a la viabilidad del cultivo, el parásito fue capaz de invadir eritrocitos tras la purificación, completar su ciclo de infección e iniciar un nuevo ciclo de invasión, lo cual es un indicador de su salud. Además, se vio que la incorporación de hipoxantina tritiada era similar a los cultivos no sujetos al protocolo descrito en este trabajo (Tabla 1.3), indicando que ambos crecían de igual manera. A pesar de ello, se recomienda recoger el cultivo durante el primer ciclo de invasión, para no producir estrés al parásito por las altas parasitemias y para no perder su sincronía.

Las aplicaciones del método descrito pueden ser numerosas, pudiendo ser aplicado en su totalidad o tan solo parcialmente dependiendo de los requerimientos de cada ensayo. En resumen, aunque los métodos previos permiten obtener cultivos sincrónicos a altas parasitemias, el nuevo método supone las siguientes ventajas:

- Los cambios de medio se realizan cada dos o tres días, manteniendo el mismo hematocrito hasta llegar al paso de purificación magnética. Esto hace que sea mucho menos laborioso.
- No es necesario mantener el cultivo durante largos periodos de tiempo. Se requiere de una semana para sincronizar y un día para la obtención del cultivo a alta parasitemia, tras el paso de purificación por la columna magnética. El no tener que mantener el cultivo a alta parasitemia durante días evita la pérdida de sincronía y el posible estrés del parásito.

- Es un método muy reproducible y robusto, ya que en todos los casos siempre obtuvimos cultivos con altas parasitemias muy sincrónicas. Esto también es importante para los estudios de MS donde no es sencillo tener un alto número de réplicas debido a su coste.

5.2. CAPÍTULO 2. Establecimiento de un método de purificación de proteínas ubiquitinadas y sus proteínas de interacción

Debido a la gran complejidad del UPS, la espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas para desentrañar su implicación en diferentes procesos y condiciones. Sin embargo, su estudio conlleva una serie de dificultades, como la necesidad de un sistema de enriquecimiento previo a la espectrometría para preservar al máximo posible la cantidad de proteínas ubiquitinadas y su estado de conjugación fisiológico. Este proceso de enriquecimiento es uno de los pasos más críticos para la obtención de unos resultados de calidad.

Existen diferentes estrategias para el enriquecimiento de proteínas ubiquitinadas tal y como se ha explicado en la introducción, pero la purificación mediante TUBEs posee una serie de ventajas frente al resto de métodos utilizados. Su alta afinidad permite obtener un enriquecimiento mayor de proteínas poli y monoubiquitinadas y de sus proteínas de interacción, en el momento de la lisis celular. Además mantiene las condiciones fisiológicas puesto que no necesita una manipulación genética del sistema celular empleado, ni la utilización de inhibidores durante la lisis, ya que su sola presencia impide la acción del proteasoma y DUBs, evitando la pérdida de proteínas ubiquitinadas.

El objetivo de esta parte del trabajo fue adaptar y mejorar la unión covalente de las bolas a la trampa, mejorar la purificación de proteínas para su análisis por MS y reducir la interferencia de proteínas inespecíficas, utilizando columnas de afinidad. Estas mejoras permitieron utilizar muestras de eritrocitos sin infectar e infectados con *P. falciparum*.

Tal y como puede observarse en el CAPÍTULO 2, el método se estableció en paralelo en diferentes laboratorios y con diferentes fuentes celulares. Las

condiciones para la purificación de proteínas ubiquitinadas de líneas establecidas de linfoma de células del manto (mantle cell linfoma, MCL), se establecieron en la institución CICbioGUNE por la Dr. Wendy Xolalpa. El protocolo descrito en este trabajo, para la purificación de proteínas ubiquitinadas a partir de eritrocitos infectados con *P. falciparum*, fue establecido en paralelo en GlaxoSmithKline. Para la optimización, cada uno de los pasos fue controlado por SDS-PAGE, utilizando distintas tinciones y/o Western blot con anticuerpos anti-ubiquitina. Ambos métodos son muy similares, aunque el trabajo con muestras infectadas, donde la hemoglobina está presente, requirió de la puesta a punto de pasos adicionales.

Con el fin de evitar la elución de la trampa junto con las proteínas ubiquitinadas, se puso a punto un nuevo protocolo de captura con bolas de agarosa unidas covalentemente a las TUBEs, a través del glutatión y el GST. Este paso era requerido para la identificación de las proteínas por MS, ya que la presencia de la trampa interfería en el proceso. Para su optimización se probaron varios reactivos que producen la unión covalente, obteniendo mejores resultados con el DMP. El número de lavados realizados tras generar la unión covalente también fue optimizado, monitorizándose la elución de las TUBEs por Western blot con un anticuerpo anti-GST.

Las proteínas ubiquitinadas a purificar mediante las TUBEs-Agarosa, provenían de eritrocitos no infectados e infectados. Para su obtención, se llevó a cabo el protocolo descrito en el capítulo 1, en el laboratorio de bioseguridad nivel 3. Por normativa, para poder trabajar con las muestras fuera de dicho laboratorio, las muestras debían permanecer congeladas al menos durante 24 horas. Por ello se comprobó por Western blot con un antianticuerpo anti-ubiquitina, que la congelación no afectaba al número de proteínas capturadas por las TUBEs. El protocolo de lisis también fue optimizado con parásito libre de eritrocito, testándose diferentes bufferes de lisis y métodos. Por ejemplo ciclos de congelación/descongelación, vortex, sonicación y ruptura mecánica con bolas de cristal. Las mejores condiciones fueron elegidas en base a la obtención de una mayor cantidad de proteínas, la cual fue medida por Bradford.

La optimización de la captura de las proteínas ubiquitinadas por la trampa, lavados y elución no fue sencilla, debido a la presencia de la hemoglobina de los

eritrocitos. La optimización de los distintos pasos hizo necesaria la monitorización por SDS-PAGE y por Western blot con anticuerpos anti-ubiquitina y anti-GST. Para determinar la cantidad de proteínas óptima por μg de TUBEs, que no producía la saturación de la trampa, la fracción no unida a las TUBEs (flow-through) debía ser analizada por Western blot con un anticuerpo anti-ubiquitina. Sin embargo, la presencia de hemoglobina en el flow-through impedía que la muestra pudiese ser cargada en el gel de acrilamida/bisacrilamida, ya que la muestra precipitaba al ser hervida a 95° con el tampón Laemmli. Con el fin de evitar la agregación, se probaron diferentes técnicas como la sonicación o la utilización de detergentes, resultando ser la adición de 10 mM SDS y 0.5 M de NaOH la más eficaz.

Una vez establecida la cantidad de eritrocitos óptima por μg de TUBEs, se realizó el escalado del cultivo hasta que las proteínas ubiquitinadas capturadas pudieron ser observadas en un gel de acrilamida/bisacrilamida teñido con plata. Así se determinó la cantidad de eritrocitos requerida para poder identificar las proteínas por MS. La tinción de plata también fue utilizada para la determinación del tiempo de captura, el número de lavados y los bufferes a utilizar, llegando a un compromiso entre la cantidad de proteínas ubiquitinadas capturadas por las TUBEs, y las proteínas inespecíficas observadas con el control GST.

Por otro lado, la alta afinidad de las proteínas ubiquitinadas por las TUBEs provocó dificultades durante la elución de las proteínas capturadas. El número de pasos de elución y tampones fueron optimizados para lograr separar las proteínas ubiquitinadas de la trampa, analizando las proteínas eluidas por Western blot con un anticuerpo anti-ubiquitina. A pesar de realizar dos eluciones con cloruro sódico 1M, seis con glicina 200 mM a un pH de 2.5 y cuatro con SDS al 1%, precalentado a 60°C (figura 2.2), aún una pequeña parte de proteínas ubiquitinadas permaneció unida a las TUBEs.

Una vez purificadas las proteínas ubiquitinadas, se enviaron congeladas en hielo seco para su procesamiento por el servicio de proteómica del CICbioGUNE. El protocolo utilizado para el análisis por MS se encuentra descrito en *Azkargorta et al.* (Azkargorta et al., 2016). El volumen de las muestras enviadas al departamento de proteómica era muy grande debido al gran número de pasos requeridos en la elución, haciendo necesario liofilizar la muestra, diluirla en un menor volumen, y

precipitar las proteínas para eliminar los componentes de la muestra que interferían en el proceso de MS. Este proceso hubo de ser optimizado, ya que el contenido de SDS de la muestra era elevado, lo que impedía que las muestras migraran correctamente por SDS-PAGE y la formación de bandas discretas (Figura 2.2).

5.3. CAPÍTULO 3. Análisis del ubiquitoma de *P. falciparum* y su hospedador a lo largo de su ciclo de infección intraeritrocítico.

5.3.1. Análisis global y comparativa con trabajos publicados

Utilizando el método de captura con TUBEs previamente comentado, se logró aislar las proteínas ubiquitinadas y su interactoma de células de *P. falciparum* y su hospedador, a lo largo de su ciclo intraeritrocítico. Dos de las muestras con proteínas purificadas de cada una de las condiciones (eritrocitos no infectados, eritrocitos infectados con anillos, trofozoitos y esquizontes) fueron analizadas por LC-MS/MS. A pesar de haberse optimizado las condiciones para reducir el número de proteínas inespecíficas, aún pudieron observarse proteínas capturadas a través del GST (Figura 3.1C). Sin embargo, la cantidad de proteínas totales purificadas con las TUBEs fue mayor, estando las proteínas ubiquitinadas tan solo presentes en las muestras capturadas con TUBEs (Figura 3.1).

El número total de proteínas identificadas por MS fue de 1237 proteínas (683 humanas y 554 del parásito) (Figura 3.S3). Se encontraron marcas de ubiquitinación (aducto gly-gly) tan solo en 12 de ellas (Tabla 3.1), dificultando la discriminación entre proteínas ubiquitinadas y proteínas de interacción. En cuanto al tipo de cadenas de poliubiquitina encontradas, se detectaron cadenas de tipo K6, K63, K11, K48, aunque las más abundantes fueron las dos últimas (Figura 3.2), ambas relacionadas con la degradación por el proteasoma. Los dominios de unión UBA provienen de la proteína RAD23, cuya función es llevar las proteínas ubiquitinadas al proteasoma. Aunque se ha visto que las TUBEs son capaces de capturar los diferentes tipos de cadenas, la unión de proteínas reguladas por el

proteasoma podría estar de alguna manera favorecida por este hecho. Las cadenas K63 tan solo se encontraron en el estadio de trofozoito, quizá por su implicación en la endocitosis y en la replicación (introducción sección 2.2.1.).

Del total de proteínas identificadas, tan solo 360 proteínas fueron exclusivas de las TUBEs, haciendo necesario aplicar algún filtro de selección con el fin de seleccionar las proteínas con mayor probabilidad de formar parte del ubiquitoma, y así generar resultados más fiables y robustos. Las proteínas consideradas como enriquecidas en la muestra TUBEs, fueron aquellas en las que la diferencia entre las cuentas del espectro obtenidas en las TUBEs y las obtenidas en el control GST fue de al menos 1,5 veces en las dos réplicas de alguna de las cuatro condiciones analizadas. Este criterio de selección fue bastante restrictivo y llevó a la eliminación de algunas proteínas cuya ubiquitinación es conocida, por ejemplo algunas subunidades del proteasoma. Tras el filtrado, un total de 196 proteínas (90 humanas y 106 del parásito) fueron consideradas como enriquecidas para su análisis posterior (Figura 3.4).

Como se ha comentado anteriormente, paralelamente a nuestro trabajo, dos grupos de investigación llevaron a cabo la purificación de proteínas ubiquitinadas de *P. falciparum* en su etapa intraeritrocítica, tras aislar el parásito previamente del eritrocito. La primera publicación fue de *Ponts et al* (Ponts et al., 2011). En este trabajo, las proteínas ubiquitinadas de las tres etapas intraeritrocíticas (anillos, trofozoitos y esquizontes), fueron inmunoprecipitadas mediante un anticuerpo anti-ubiquitina y analizadas por MudPIT (cromatografía líquida en 2D acoplada a MS). Como control negativo se utilizó la muestra inmunoprecipitada sin la presencia del anticuerpo anti-ubiquitina. Las proteínas enriquecidas consideradas fueron aquellas ausentes en los controles negativos (inmunoprecipitación sin anticuerpo anti-ubiquitina), o aquellas inmunoprecipitadas en mayor medida con respecto al control negativo ($p\text{-values} < 0.05$ en al menos una de las etapas intraeritrocíticas). Así, identificaron 439 proteínas (437 si se eliminan dos proteínas repetidas en su lista), considerando 74 enriquecidas. En cuanto al tipo de cadenas identificadas, obtuvieron el mismo tipo de cadenas que en nuestro trabajo, K6, K11, K48 y K63, aunque una mayor proporción de K63 y K48. Podría suceder

que en *P. falciparum* solo existieran este tipo de cadenas, al menos son las únicas que han sido confirmadas hasta el momento.

En la segunda publicación (Wang et al., 2015), se desarrollo una trampa con los dominios de unión al proteasoma de la proteína RAD23, para capturar el proteasoma y aquellas proteínas unidas a éste en la etapa de esquizontes (Figura I.21). En este caso como control se utilizó el GST, considerando proteínas inespecíficas aquellas en las que se encontraban al menos dos péptidos en alguna de las réplicas analizadas del control. Para evitar la pérdida de proteínas con interacciones transitorias, antes de la lisis los parásitos fueron tratados con formaldehído al 1% para unir las interacciones de forma covalente. De esta manera obtuvieron un total de 274 proteínas, considerando enriquecidas 243. 110 de dichas proteínas tan solo fueron identificadas en presencia del formaldehído.

Al comparar las listas de proteínas identificadas en los respectivos datos suplementarios de cada una de las publicaciones (considerando tan solo las proteínas provenientes del parásito en nuestra publicación), sin eliminar las no enriquecidas, puede observarse que el número de proteínas totales obtenido, así como el número de proteínas exclusivas, es mayor en el caso de la captura con TUBEs (Figura D.1A). Esto podría deberse por un lado a la gran afinidad de la trampa por las proteínas ubiquitinadas, y a la protección que ejerce frente a los procesos de des-conjugación y degradación durante el proceso de captura, y por otro a que en nuestro trabajo el parásito no se fue aislado previamente de su hospedador, pudiendo perder un menor número de proteínas del parásito presentes en el eritrocito. Gracias al método establecido, además de purificar un mayor número de proteínas totales del parásito, se ha logrado identificar proteínas del hospedador, pudiéndose estudiar también procesos en los cuales podría darse una intercomunicación entre el eritrocito y *P. falciparum*.

En cuanto a las muestras analizadas por Wang et al., tan solo contienen proteínas de la etapa de esquizonte. Si se analizan las proteínas obtenidas en esta fase mediante los tres métodos (Figura D.1B), puede observarse que en el caso de Ponts et al. y en nuestra publicación, el número de proteínas identificadas continúa siendo mayor que en Wang et al. Esto posiblemente se deba a que las proteínas obtenidas en Wang et al. son sustratos del proteasoma, mientras que en Ponts et

al. y en nuestro trabajo se analizaron todas las proteínas ubiquitinadas en su conjunto, pudiendo haber proteínas implicadas en otros procesos. Las diferencias observadas en la fase de esquizontes con *Ponts et al.* podrían deberse a los diferentes métodos de sincronización utilizados, ya que en nuestro caso la sincronización es mayor (3 ciclos de sincronización vs 1 ciclo en *Ponts*), pudiendo estar perdiendo proteínas presentes en otras fases.

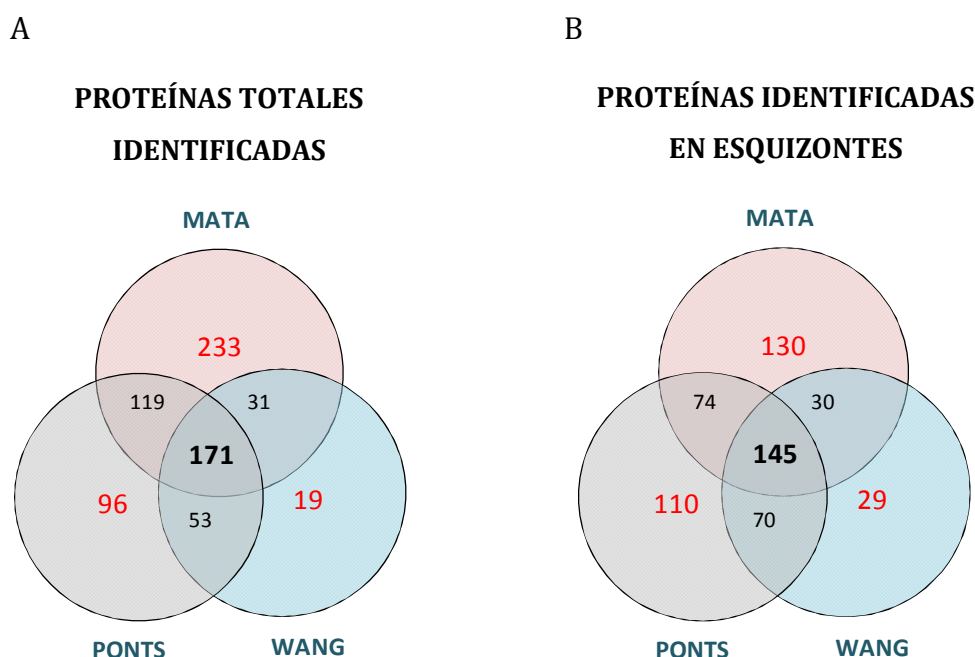


Figura D. 1. Diagramas de Venn de las proteínas identificadas por MS en *P. falciparum* en los tres trabajos publicados. A. Comparación del número total de proteínas identificadas. B. Comparación del número de proteínas identificadas en la etapa de esquizonte.

En la Figura suplementaria 3.S10, se muestra una comparativa con la publicación de *Ponts et al.*, observándose una pérdida de solapamiento al tener en cuenta tan solo aquellas proteínas consideradas como enriquecidas. En la publicación de *Wang et al.* también se ha observado la eliminación de proteínas no enriquecidas que han sido obtenidas por los otros dos métodos de captura publicados. Quizá un análisis global considerando las proteínas comunes identificadas, podría enriquecer en mayor medida los procesos en los cuales el UPS está implicado en el parásito.

5.3.2. Análisis de los componentes del UPS

El número de proteínas ubiquitinadas obtenidas a lo largo del ciclo de infección varió tanto en el eritrocito como en el parásito (Figura 3.4). En el parásito la mayor parte de ellas se encontraron en la etapa de esquizonte. En el hospedador sin embargo se dio el caso contrario. Inmediatamente después de la infección se produjo un incremento, pero tras éste se vio una disminución progresiva a lo largo del ciclo. La mayoría de las proteínas identificadas fueron también diferentes, sobre todo en el parásito. Esto podría estar relacionado con el alto recambio proteico que tiene lugar durante la infección.

Una de las mayores dificultades intrínsecas a este tipo de estudios es integrar toda la información obtenida por MS, para determinar los procesos en los cuales se producen los cambios más significativos y poder llegar a las conclusiones correctas. Por este motivo, se utilizaron varias herramientas bioinformáticas. Las proteínas consideradas enriquecidas en ambos organismos fueron sometidas a análisis de ontología genética (GO) en las diferentes categorías: procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y funciones moleculares (MF). Por otro lado, se realizó un análisis mediante el software IPA. Dicho software fue muy útil para establecer relaciones entre proteínas, funciones y vías de señalización, ya que tiene acceso a multitud de datos publicados en humano. Para llevar a cabo este análisis, se buscaron las proteínas homólogas humanas de las proteínas del parásito identificadas por MS, aunque algunas de ellas eran únicas en *P. falciparum*, teniendo que ser analizadas aparte.

Aunque en este trabajo no se realiza una MS cuantitativa, la cuantificación del número de veces que aparecen los péptidos relacionados con una proteína en particular, ha permitido detectar niveles de enriquecimiento de las proteínas en las distintas etapas. En la Figura 3.5 se representa la media del logaritmo del ratio de las cuentas espectrales TUBEs/GST mediante un código de color, englobándose las proteínas según su categoría funcional en GO. Como puede observarse, los procesos regulados por el UPS variaron a lo largo de las diferentes etapas. La mayoría de las proteínas identificadas pertenecían al UPS, por ello aparecieron categorías como “proteasome complex”, “endopeptidase activity” y threonine-type

peptidase activity”. Al igual que se observó en la Figura 3.4, parece existir una interconexión entre el UPS del hospedador y del parásito. La captura de las proteínas del UPS podría deberse a su interacción con las proteínas ubiquitinadas reconocidas por las TUBEs, o a su propia ubiquitinación. En cualquier caso, el incremento o disminución de su presencia en las diferentes etapas podría ser un reflejo de su actividad. Estos cambios podrían ser mucho más pronunciados, ya que no se ha de olvidar que las muestras de eritrocitos infectados, poseen también un 60% de no infectados (40% parasitemia).

En la Figura 3.6 se muestran los nombres de las proteínas del UPS identificadas y su presencia a lo largo del ciclo en cada organismo. Tal y como puede observarse, las E3 ligasas del parásito TRIP12, UPL1 (homóloga a la HUWE1 humana), UBE4B, Cullina 1 y AARP1 aparecieron en la etapa de esquizontes, mientras que la RNF115 se incrementó gradualmente a lo largo del ciclo. La DUB MOV34, cuyo ortólogo humano es la subunidad no ATPasa reguladora 14 del proteasoma, se encontró más enriquecida en la etapa de anillo y trofozoito. El incremento de proteínas ubiquitinadas en la etapa de esquizonte podría ser debido a un aumento ligasas y a una disminución de DUBs. Por otro lado también se identificaron distintas subunidades del proteasoma 20S y 19S del parásito, detectándose sobre todo en las últimas etapas. Dos subunidades del proteasoma, la RPN7 y la RPN10, y la E3 ligasa HUWE1, fueron analizadas por Western blot (Figura 3.6B), observándose en todas ellas un incremento de las formas de alto peso molecular, que podrían corresponder a sus formas ubiquitinadas en las etapas tardías de la infección. En el caso del hospedador, las E3 ligasas HUWE1, KCMF1 estaban enriquecidas en la etapa de anillo, mientras que las E3 ligasas UBR4 y RNF123 incrementaron a lo largo del ciclo. Tan solo se encontró una DUB, la USP5, que apareció tras la infección, sobre todo en la fase de anillo y trofozoito. Por tanto, la correlación entre presencia de DUBs y ligasas con el nivel de proteínas ubiquitinadas encontradas no fue tan clara como en el parásito. En cuanto al proteasoma, la mayoría de las subunidades del 19S y 20S identificadas disminuyeron a lo largo del ciclo.

Los niveles basales de proteínas ubiquitinadas en el eritrocito no infectado fueron bajos debido a la reducida actividad de su UPS. Por ello llama especialmente

la atención como la entrada del parásito produjo un aumento en dichos niveles, lo que podría deberse a la respuesta ante la infección por parte del hospedador, como sucede en otros sistemas celulares. La disminución en las proteínas ubiquitinadas del eritrocito a lo largo de la infección podría ser causada por una depleción en el ATP, que llevaría a una disminución en la actividad catalítica del proteasoma. Sin embargo, todos estos cambios también podrían ser originados por una manipulación por parte del parásito, como sucede con otros patógenos. Las proteínas identificadas del UPS del parásito son proteínas homólogas a las humanas, pudiendo alguna de ellas estar mimetizando las propias proteínas del hospedador. También podría darse el caso de tener alguna proteína nueva del UPS entre las proteínas identificadas con función desconocida en el parásito. El estudio de los niveles de proteínas ubiquitinadas producidos en parásito y hospedador podría ser objeto de futuras investigaciones, aclarando el motivo real de los cambios producidos.

5.3.3. Análisis de los procesos regulados por el UPS en el ERITROCITO durante la infección

Además de proteínas relacionadas con el UPS, se identificaron proteínas enriquecidas pertenecientes a numerosos procesos que podrían estar regulados por ubiquitinación durante la infección en el hospedador.

En las Figuras suplementarias del capítulo 3.S4-S6 se muestra el análisis GO en las categorías “BP”, “CC” y “MF” a lo largo de las diferentes fases. En el hospedador tras la infección, aparecen nuevas categorías “BP” como la respuesta a “estrés oxidativo” en anillos, “transporte de proteínas” en la etapa de trofozoito, y relacionadas con la “anafase” en esquizontes. En anillos tras la infección aparecen también en el hospedador proteínas de las categorías “CC” “complejos macromoleculares”, “orgánulos no unidos a membrana” y “desmosoma”. En cuanto a las categorías “BF”, el cambio más significativo es la aparición de la categoría “actividad ATPasa” en anillos y “unión a ATP” en esquizontes. Todos estos cambios en el hospedador están relacionados con las funciones que el parásito lleva a cabo en cada etapa. En la etapa de anillo el UPS del eritrocito podría favorecer la entrada

del parásito, en la etapa de trofozoito el transporte de proteínas y el metabolismo de los nutrientes, y en la etapa de esquizontes la replicación del ADN y la división celular del parásito. Entre las proteínas del hospedador con aductos gly-gly encontradas (Tabla 3.1) estaban proteínas implicadas en el metabolismo, como la “Succinate–semialdehyde dehydrogenase” en trofozoitos, y la proteína “D–tyrosyl–tRNA (Tyr) deacylase” en la etapa de esquizontes, involucrada en la replicación del ADN. El eritrocito maduro es una célula sin núcleo y por tanto en principio carente de ADN, replicación y otros procesos relacionados con la síntesis de proteínas, lo que indicaría una posible manipulación a favor de la replicación del parásito.

Además de los procesos ya comentados, los cambios más significativos en los eritrocitos fueron en la categoría “**plegamiento de proteínas**” en GO (Figura 3.5), y las vías de señalización “gluconeogénesis” y “glicolisis” en esquizontes, “acetil-coA biosíntesis” en todas las etapas de infección, “**endocitosis mediada por clatrina**” y “**respuesta a estrés oxidativo mediado por la vía NRF2**” en trofozoitos, siendo las dos últimas las más abundantes (Figura 3.S7).

a) Respuesta a estrés oxidativo mediado por la vía NRF2

El estrés oxidativo ejerce un papel esencial en la infección por *P. falciparum*. Se sabe que un incremento del estrés oxidativo por parte del hospedador produce la destrucción del parásito, lo que está relacionado con la protección de ciertos pacientes frente a la malaria (Percario et al., 2012). Por otro lado, el papel fundamental del eritrocito es el transporte de oxígeno desde los pulmones a los tejidos, estando constantemente expuesto a altos niveles de oxígeno y al daño oxidativo. La lenta autooxidación de la hemoglobina (Abugo and Rifkind, 1994), lleva a la producción de metahemoglobina y superóxido, que rápidamente se transforma en peróxido de hidrógeno. *P. falciparum* utiliza la hemoglobina del eritrocito como fuente principal de aminoácidos, incrementando su nivel oxidativo basal por la liberación de grandes cantidades del grupo hemo. Por todo esto, no es de extrañar que la respuesta a estrés oxidativo sea una de las vías más enriquecidas en el eritrocito y que el UPS tenga un papel fundamental en este proceso.

Los mecanismos de defensa celulares frente al estrés oxidativo incluyen a enzimas y moléculas antioxidantes, chaperonas moleculares y a sistemas proteolíticos como el proteasoma. Para minimizar los efectos frente al estrés oxidativo y neutralizar las especies reactivas de oxígeno, los eritrocitos poseen un extenso sistema antioxidante. Dicho sistema implica antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular como el glutatión y el ácido ascórbico, que inactivan directamente los radicales libres, y antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa (Gonzales et al., 1984), la glutatión peroxidasa (Nagababu et al., 2003) y la peroxiredoxina-2 (Nagababu et al., 2013), que convierten las moléculas tóxicas en formas excretables por la célula (Mohanty et al., 2014).

En la mayoría de las células la activación de los genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo está principalmente mediado por la secuencia promotora ARE (antioxidant response element) (Rushmore et al., 1991). Dicha secuencia se encuentra en genes como la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato-quinona oxidoreductasa (NQO1), la hemo oxigenasa (HMOX1), la glutatión-S-transferasa (GST), la ferritina, la glutamylcisteína sintetasa, etc. (Loboda et al., 2016). La secuencia ARE es activada por la unión de los factores de transcripción NRF1 y NRF2 (Moi et al., 1994). NRF2 es un elemento clave en la regulación de diferentes vías antioxidantes. Por ejemplo regula la producción y regeneración del glutatión (GSH), a través de enzimas como la glutatión reductasa (GR) y la GST. Está implicado en la producción y regeneración de la tioredoxina, en la producción del NADPH controlado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (Ma, 2013), y en la expresión de distintas chaperonas. NRF2 también lleva a un incremento de las subunidades catalíticas del proteasoma (Kwak et al., 2003) y a un aumento de la respuesta de la vía ERAD (Digaleh et al., 2013). En este estudio se ha visto que tras la infección aparecen proteínas reguladas por NRF2 como las cochaperonas HSP40 DNAJB1, DNAJB2 (Jacobs and Marnett, 2007) y las enzimas GR y GST (Ma, 2013). En otros tipos celulares el UPS regula la proteína NRF2, a través de su unión a la proteína adaptadora KEAP1 y a la E3 ligasa Cullina 3, que la lleva a ser degradada por el proteasoma (Itoh et al., 2003). En presencia de estrés oxidativo no se produce la unión, liberándose NRF2 e incrementándose los genes regulados por este factor (Ma, 2013).

En células de linaje hematopoyético existe una secuencia similar a la ARE llamada NF-E2/AP1, en la región reguladora del gen de la globina (Chan et al., 2001). El papel de la proteína NRF2 parece ser llevado a cabo por p45NF-E2. Se ha visto que los eritrocitos de ratones deficientes en p45NF-E2 poseen un menor nivel de ARNm de catalasa y GST, siendo sensibles a estrés oxidativo y acumulando altos niveles de radicales libres de oxígeno (Chan et al., 2001). Por tanto, parece ser que el eritrocito es capaz de inducir de alguna manera una respuesta a estrés oxidativo, a pesar de su limitada capacidad biosintética. Sin embargo los mecanismos moleculares por los cuales se regulan estos procesos son aún desconocidos.

El factor de transcripción NRF2 también está implicado en la resistencia del hospedador frente a la infección en diferentes patógenos y sistemas celulares. Por ejemplo se ha visto que la delección en el alelo correspondiente a NRF2 en el ratón, aumenta su resistencia frente a la infección por el virus Marburg (Page et al., 2014). El virus Marburg posee una proteína, la VP24 que se une al dominio KELCH de KEAP1 impidiendo la unión del complejo e induciendo la activación de la vía NRF2. Otros virus como el influenza (Kesic et al., 2011) o el dengue (Olagnier et al., 2014), e incluso bacterias intracelulares como *Salmonella typhimurium*, también inducen la vía NRF2 del hospedador (Nairz et al., 2013).

Particularmente, en malaria se ha visto que la activación de la vía NRF2 con Sulforafano, en monocitos de ratón, promueve la resistencia frente a la infección por *Plasmodium* (Olagnier et al., 2011). Además se ha visto que la vía NRF2 está implicada en la protección frente a la malaria cerebral (Jeney et al., 2014; Soares and Ribeiro, 2015). El tratamiento con óxido nítrico en ratones lleva a la activación de la vía NRF2, la cual induce la expresión de la HMOX1, y ésta a su vez la producción de monóxido de carbono (CO). El CO se une al grupo hemo de la hemoglobina libre generada durante la infección intraeritrocítica, previniendo su participación en la patogénesis de la malaria cerebral. Por otro lado existen mutaciones en diferentes genes que confieren protección frente a la malaria, como la deficiencia en la G6PD o la hemoglobina falciforme, que podría ser mediada por diferentes mecanismos que convergen en la vía NRF2 (Ferreira et al., 2011). Por ejemplo en ratones se ha visto que la hemoglobina falciforme protege de la malaria cerebral mediante la inducción de la HMOX1.

***b) Proteínas implicadas en la vía de plegamiento de proteínas.
Chaperonas***

Cuando el estrés oxidativo excede la capacidad antioxidante de la célula, se produce una acumulación de radicales libres que dañan los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, afectando su actividad, solubilidad y estabilidad. Las chaperonas (HSPs), englobadas dentro de la categoría GO “plegamiento de proteínas”, y algunas pertenecientes también a la vía NRF2, previenen la agregación de proteínas, repliegan las proteínas dañadas a una conformación correcta, y si la reparación de las proteínas dañadas no es posible, las llevan a degradar al proteasoma. Además de degradar las proteínas reconocidas por las chaperonas, también se ha visto que el proteasoma 20S es capaz de degradar más rápido proteínas oxidadas que en su forma nativa, de manera independiente a ubiquitina y a la subunidad 19S (Ferrington et al., 2001). Debido a su papel fundamental en la estabilidad del proteoma, las chaperonas están altamente reguladas a nivel tanto transcripcional como postraducciona, incrementándose ante diferentes condiciones de estrés medioambiental como la hipoxia, estrés oxidativo y la exposición a toxinas.

Existen muchos tipos diferentes de chaperonas con diferentes papeles espaciales y temporales en la proteostasis. Pueden ser divididas en chaperonas independientes o dependientes de ATP. Dentro del primer tipo de chaperonas se encuentran las chaperonas de bajo peso molecular como la HSP27 (Heat shock protein β 1), proteína encontrada enriquecida en el eritrocito en este trabajo durante la etapa de trofozoito. Este tipo de chaperonas previenen la agregación de proteínas parcialmente desplegadas y llevan a la degradación de las proteínas dañadas por el proteasoma (Li et al., 2013). La HSP27 es regulada por modificaciones postraduccionales y es inducida bajo condiciones de estrés (Haslbeck et al., 2005). En determinados tipos de cáncer, se ha visto que se incrementa confiriendo protección frente a la apoptosis mediante diferentes mecanismos (Garrido et al., 1997). Uno de ellos es mediante un aumento de la actividad de la proteína NF κ B, ya que la HSP27 produce un aumento de la degradación de la proteína I κ B, el inhibidor principal de NF κ B (Parcellier et al., 2003). Diferentes patógenos intracelulares regulan la muerte celular del

hospedador a través de la vía de señalización NFκB para poder sobrevivir. Este es el caso por ejemplo del patógeno bacteriano intracelular *Coxiella burnetii*, el cual lleva a una reducción de la apoptosis de su hospedador (células de macrófagos THP1) a través de la regulación de distintas kinasas (Voth and Heinzen, 2009). Una de las proteínas cuya fosforilación se ve incrementada inmediatamente después de la infección, es la HSP27. *Legionella pneumophila* también induce cambios similares tras la infección mediante la activación de la vía NFκB de su hospedador (Molestina et al., 2000).

Además de las chaperonas pequeñas independientes de ATP, en este trabajo también se han detectado chaperonas del eritrocito dependientes de ATP que incrementan progresivamente a lo largo del ciclo. Por ejemplo, la cochaperona DNAJB1, de la familia de las HSP40, y las distintas subunidades del complejo TRiC.

La familia de las HSP40s son un grupo de cochaperonas caracterizadas por poseer un dominio conservado DNAJ. Son responsables de la regulación de la actividad ATPasa de las chaperonas HSP70s (Tsai and Douglas, 1996). Las HSP70s interaccionan a su vez con CHIP (Vembar and Brodsky, 2008). CHIP es una E3 ligasa que cataliza la ubiquitinación de proteínas mal plegadas para su degradación por el proteasoma, pero también para vías independientes de degradación, a través de la unión de cadenas K27 y K63 al substrato (Alberti et al., 2002). Las chaperonas también están relacionadas con el tráfico de vesículas mediado por clatrina. Por ejemplo, se ha visto que el desensamblaje del revestimiento de los cotámicos de clatrina está mediado por la chaperona HSP70, con ayuda de cochaperonas que unen ATP (Sousa and Lafer, 2015).

Las HSP40s juegan papeles esenciales en la expresión de proteínas e iniciación de la traducción, plegado y desplegado de proteínas, así como en su translocación y degradación. Al igual que otras chaperonas, también están implicadas en diferentes enfermedades, entre ellas las infecciones microbianas. Por ejemplo, se sabe que las cochaperonas HSP40 del hospedador son esenciales para incrementar la expresión de los genes víricos del virus HIV-1, así como su replicación. La proteína NEF de este virus, es capaz de interaccionar con una HSP40, facilitando la expresión génica mediante la formación de un complejo de transcripción asociado a la CDK9 (Kumar and Mitra, 2005). El citomegalovirus humano HCMV por su

parte, utiliza la HSP40 DNAJB6 humana para interactuar con la proteína vírica UL70, implicada en la replicación del ADN vírico, e importarla al núcleo (Pei et al., 2012). También existen ejemplos particulares para la HSP40 DNAJB1 encontrada en este estudio. El virus influenza A utiliza la DNAJB1 de su hospedador para transportar al núcleo sus ribonucleoproteínas en las primeras etapas de la infección. Su inhibición lleva a la disminución de la función polimerasa viral, reduciendo la replicación viral (Batra et al., 2016).

El complejo TRiC eucariota por su parte, está formado por dos anillos compuestos de 8 subunidades distintas (CCTs) codificadas por diferentes genes (Leitner et al., 2012). Entre las subunidades CCTs de eritrocito encontradas en este estudio estaban la CCT3, CCT4, CCT6, CCT7 CCT8 y TCP1, incrementándose a lo largo del ciclo. Parece ser que el complejo TRiC podría estar implicado en el plegado de proteínas recién sintetizadas gracias a la hidrólisis de ATP en su cavidad (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Se ha visto que chaperonas dependientes de ATP como la HSP70 y HSP90 podrían estar cooperando, transfiriéndole al complejo distintos substratos. Se estima que el complejo TriC está implicado en el plegamiento del 5-10% de las proteínas citosólicas (Dekker et al., 2008; Kabir et al., 2011). Entre ellas se encuentran proteínas implicadas en tumorigénesis y ciclo celular como p53 (Trinidad et al., 2013), las ciclinas B y E (Kasembeli et al., 2014), y la proteína CDC20 (Camasses et al., 2003), todas ellas reguladas por el UPS. Además, la degradación de las propias CCTs parecen estar también reguladas directamente a través del proteasoma (Yokota et al., 2000). Los péptidos ubiquitinados de la proteína CCT3 (T-complex protein 1 subunit gamma) encontrados en este trabajo (Tabla 3.1) confirman el papel del proteasoma en la regulación del complejo.

El complejo TRiC del hospedador es utilizado por los patógenos en su propio beneficio. Este es por ejemplo el caso de *Bacillus anthracis*, la toxina del Antrax (Slater et al., 2013), liberada en el citoplasma del hospedador tras ser translocada desde los endosomas gracias a la ayuda de las CCTs. Parece que el complejo podría ser reclutado en los endosomas por chaperonas como la HSP70 y la prefoldina, que reconocerían el péptido de la toxina desplegado. Una vez en el endosoma, el complejo TriC interactuaría con la toxina que emerge a través del poro del

endosoma, de manera similar a una proteína recién sintetizada, translocándola al citoplasma. El complejo TRiC también interacciona con otras proteínas exógenas de patógenos como el antígeno nuclear del virus Epstein-Bar, la proteína cápside del virus de la hepatitis B, la proteína P4 del virus Mason-Pfizer (Yam et al., 2008) y con la ARN polimerasa NS5B y la PB2 del virus de la hepatitis C e influenza A respectivamente, siendo esencial para la replicación viral (Inoue et al., 2011; Fislova et al., 2010).

El análisis por IPA realizado en este trabajo, identificó a los factores de transcripción HSF1 y HSF2 (heat shock factors) (Sistonen et al., 1994; Morimoto and Santoro, 1998) como posibles reguladores de las proteínas enriquecidas involucradas en la respuesta a estrés. En otros tipos celulares, estos factores de transcripción se unen a una secuencia consenso HSE en la región promotora de las chaperonas, incrementando su activación ante condiciones de estrés (Akerfelt et al., 2010; Ahn and Thiele, 2003). El factor HSF1 parece estar interrelacionado con NRF2 (Dayalan Naidu et al., 2015). Se ha visto que algunos genes como la HSP70, son activados por ambos factores de transcripción, pudiendo tener papeles compensatorios.

En la Figura D.2 se muestran en color rojo las proteínas identificadas con un mayor enriquecimiento que son reguladas por los factores de transcripción HSF1 y HSF2. Como puede observarse, las proteínas del eritrocito supuestamente reguladas por dichos factores, se ven incrementadas a lo largo del ciclo de infección del parásito. En anillos es la chaperona DNAJB1 la que aparece más enriquecida, mientras que en trofozoitos aparece la chaperona HSPB1 y una de las subunidades del complejo TriC, la CCT3. Finalmente en esquizontes aparecieron enriquecidas el resto de subunidades formadoras del complejo TriC.

A pesar de la importancia que podrían tener los diferentes factores de transcripción descritos como NRF2, HSF1 y HSF2 en la regulación de las proteínas enriquecidas identificadas, no se ha de obviar el hecho de que el eritrocito es una célula carente de núcleo y que por tanto en principio carece de la capacidad de síntesis de proteínas. Existen algunos indicios de que podría existir algún tipo de síntesis proteica en eritrocitos maduros de forma independiente al núcleo, ya que se han encontrado ARNs pertenecientes a numerosos genes implicados en

metabolismo celular, síntesis de proteínas, traducción de señales, desarrollo, respuesta inmune, localización de proteínas, apoptosis, autofagia y con funciones desconocidas (Kabanova et al., 2009).

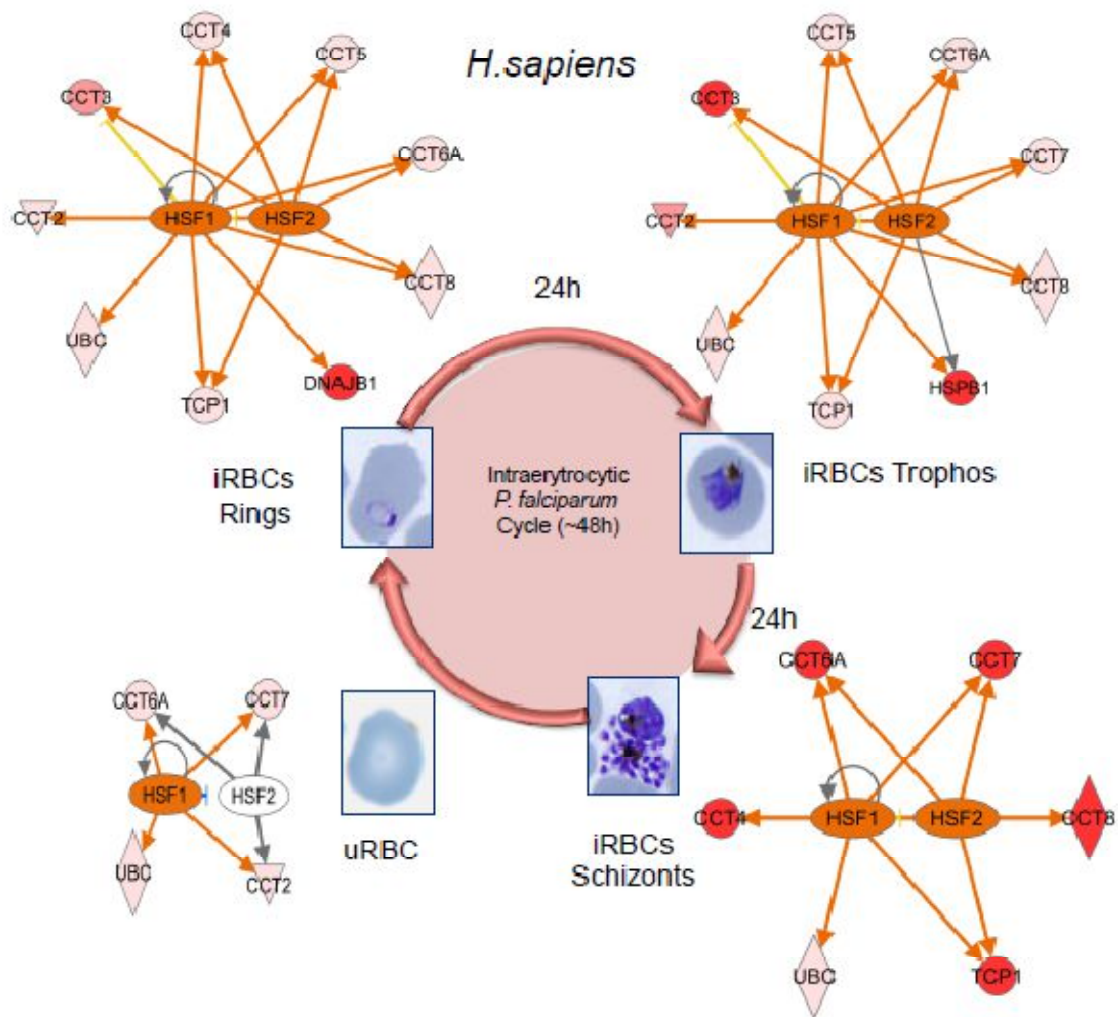


Figura D. 2. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo identificadas en el eritrocito, a lo largo de la infección y reguladas por los factores de transcripción HSF1 y HSF2 en otros tipos celulares. El color rojo indica el grado de enriquecimiento.

A pesar de ello, aunque IPA señale posibles cambios a nivel transcripcional tras la infección, los cambios que observamos en nuestro trabajo posiblemente sean debidos a cambios producidos en proteínas pre-existentes en el eritrocito, y que son modificadas para llevar a cabo una función particular debido a la infección por el parásito.

c) Vía de señalización de endocitosis mediada por clatrina

El parásito necesita para su supervivencia de mecanismos que mantengan la composición química adecuada en el interior del eritrocito, así como de mecanismos para eliminar los productos de desecho. Por ello, lleva a alteraciones en el sistema de transporte del hospedador apareciendo nuevas vías de permeabilización (Kirk, 2001) que le permiten tener acceso al medio externo del eritrocito. La vía de señalización de endocitosis mediada por clatrina fue otra de las vías encontradas como enriquecidas en el eritrocito por IPA (Figura 3.S7). Sin embargo, existe controversia sobre el hecho de si el eritrocito maduro, una vez infectado, es capaz de llevar a cabo dicho proceso. Por un lado, algunos estudios señalan que a diferencia de los eritrocitos no infectados, los eritrocitos infectados con *P. falciparum* son capaces de internalizar ferritina, sugiriendo que el parásito podría estar estimulando este proceso (Burns and Pollack, 1988). Sin embargo, otros estudios en los que se han utilizado trazadores fluorescentes de endocitosis han contradicho esta teoría (Haldar and Uyetake, 1992).

En este trabajo, tras la infección aparecieron proteínas implicadas en endocitosis, como la molécula adaptadora AP2 y más tarde la clatrina, en la etapa de trofozoito (Figura D.3 y 3.S9). Esto sugiere que el parásito podría estar manipulando el sistema de endocitosis del eritrocito a través del UPS, ya que coincide con el momento en el ciclo donde se produce la mayor actividad metabólica. La clatrina es una proteína que cubre las membranas de los endosomas en la vía trans-Golgi (Liu et al., 1995). Para su unión a las membranas, la clatrina necesita de proteínas intermediarias adaptadoras como la AP1 y AP2 (Owen et al., 2004).

Durante el proceso de endocitosis, la molécula a internalizar se une a receptores, llevando al recubrimiento de la membrana con moléculas de clatrina e induciendo su invaginación. Las vesículas recubiertas de clatrina se fusionan con el endosoma temprano y este a su vez puede dar lugar al endosoma tardío, fusionándose con el lisosoma. El UPS regula varios puntos de esta vía.

Las E3 ligasas humanas UBR4 y KCMF1 identificadas en este trabajo, podrían estar implicadas en la regulación de la endocitosis del eritrocito (Figura 3.6). En otros sistemas celulares, KCMF1 recluta RAD6A a UBR4 marcando proteínas para su degradación por el lisosoma (Hong et al., 2015). En fibroblastos, UBR4 se une a la clatrina, formando unas estructuras de malla que son necesarias para la movilidad celular, la morfogénesis de membrana, la organización del citoesqueleto y en la adhesión celular (Nakatani et al., 2005). UBR4 también está implicada en la internalización del receptor EGFR durante el proceso de endocitosis (junto con la HUWE1 encontrada en este estudio) (Tong et al., 2014), en el transporte de membrana, la señalización del Ca²⁺, la regulación del ciclo celular (Parsons et al., 2015), y en la infección por diferentes virus. Por ejemplo el virus del Dengue utiliza la UBR4 del hospedador para prevenir la respuesta de interferón tipo I del hospedador, y así poder llevar a cabo su replicación (Morrison et al., 2013). Distintos virus del papiloma como el HPV16 utilizan la proteína viral E7 para inducir la replicación y la activación del ciclo celular, dando lugar a la proliferación descontrolada de las células infectadas por el virus. Se ha visto que la interacción de la proteína E7 con UBR4 y KCMF1 podría estar mediando dicha transformación (White et al., 2012).

Cómo se verá más adelante, una de las vías más enriquecidas encontradas en *P. falciparum* fue la del sistema de transporte de proteínas *Maurer's cleft*. Este sistema podría estar también relacionado con el sistema de endocitosis del eritrocito, estando ambos regulados por las chaperonas y el UPS como sucede en otros organismos.

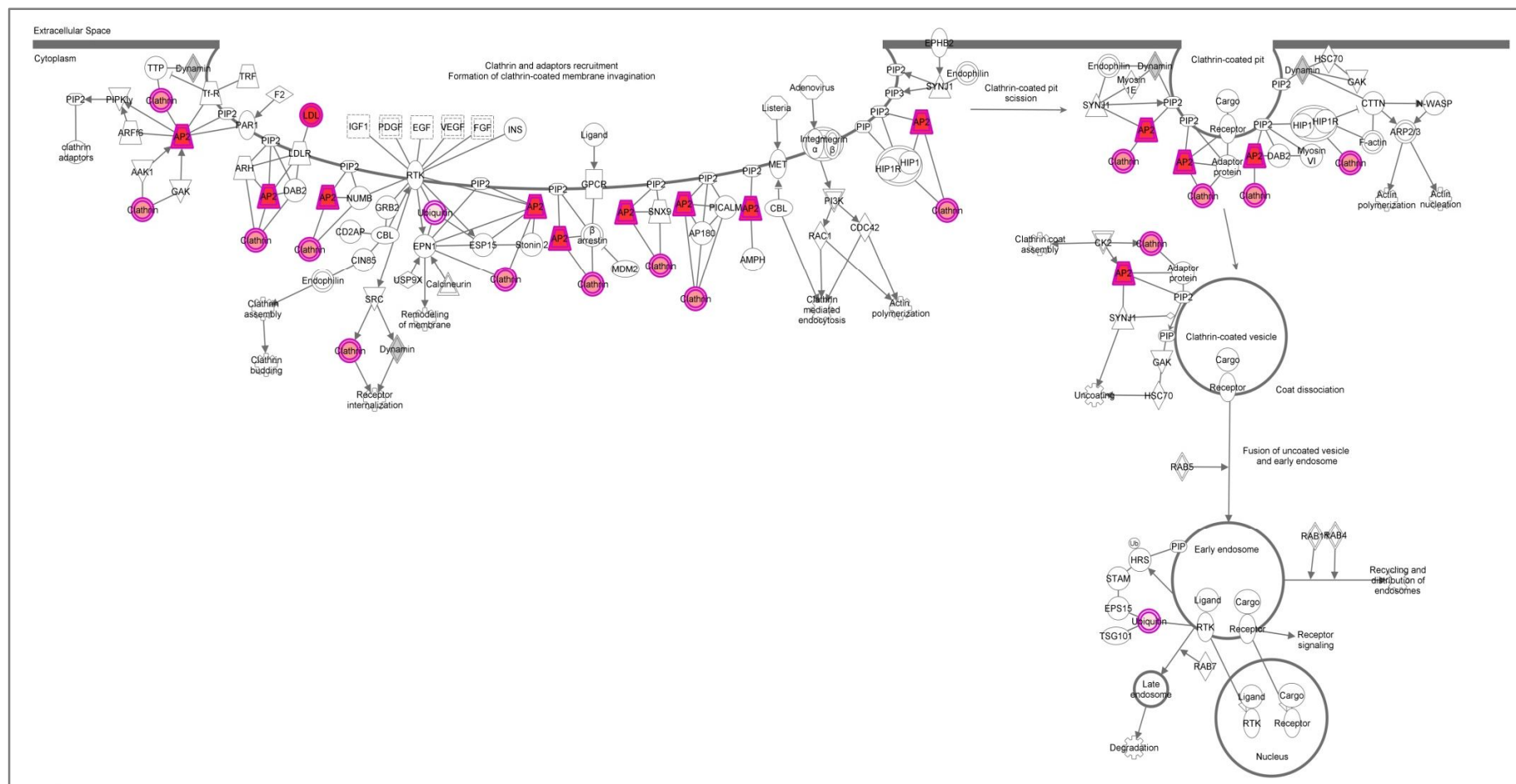


Figura D. 3. Ampliación de la vía de señalización de endocitosis mediada por clatrina (IPA) en la etapa de trofozoito (Figura 3.S9). En color rosa están señaladas aquellas proteínas enriquecidas identificadas en este trabajo.

5.3.4. Análisis de los procesos regulados por el UPS en el PARÁSITO

El UPS está implicado en un gran número de procesos esenciales para el parásito. Tal y como puede observarse en el análisis por GO (Figuras 3.S4-S6 y 3.5) y en el análisis por IPA (Figura 3.S7), el sistema está implicado en la degradación, en el plegado de las proteínas, en estrés oxidativo, en procesos metabólicos, transcripción, traducción y en la replicación del ADN. Estos resultados son similares a los obtenidos por *Ponts et al.* (Ponts et al., 2011) y *Wang et al.* (Wang et al., 2015) (Figuras I.22 y I.23). En los procesos encontrados en la categoría “BP” de GO, las categorías más destacadas están relacionadas con procesos catabólicos y metabólicos, aunque también aparece la localización de proteínas en trofozoitos, y la organización de cromatina es esquizontes. En la categoría “MF” de GO parece haber un incremento de los constituyentes estructurales del ribosoma en la etapa de esquizonte del parásito. A pesar de ello, los procesos en los cuales se producen los cambios más significativos, además del UPS, fueron la **“replicación del ADN”** en la etapa de esquizonte (Figura 3.5 y Figura 3.S7) y **“la respuesta a estrés oxidativo mediado por NRF2”** (Figura 3.S7). Por otro lado, se encontraron evidencias de la implicación del UPS en el **“transporte de proteínas y el sistema Maurer’s cleft del parásito”**. Dicho proceso no posee ortólogos humanos, y por tanto no entraría dentro de los análisis GO e IPA realizados. Además de los procesos ya comentados, se han identificado proteínas específicas del parásito implicadas en la invasión y adhesión. Las chaperonas podrían estar implicadas en todos los procesos anteriormente comentados.

a) Replicación del ADN

Todos los análisis bioinformáticos remarcan el papel del UPS en la replicación del ADN del parásito durante su etapa de esquizonte (Figura 3.5 y 3.S7), coincidiendo con la etapa donde se encontraron mayores niveles de proteínas ubiquitinadas. En consonancia con esta afirmación, está reportado que el proteasoma es esencial para la progresión en el ciclo celular, ya que inhibidores del proteasoma como la Lactacistina producen una parada en la síntesis de ADN y una pérdida de la ruptura en el esquizonte (Ponts et al., 2011).

En la Figura 3.7 se muestran distintos componentes de la horquilla de replicación en humanos. Algunos de sus homólogos en *P. falciparum* se encontraron en nuestro estudio. En color rojo se muestran aquellas proteínas que fueron consideradas enriquecidas, mientras que en color negro las proteínas identificadas pero no enriquecidas. Las proteínas más destacables encontradas fueron las MCMs que conforman el complejo Helicasa. Las MCM2, MCM3, MCM4 y MCM7 fueron consideradas enriquecidas, pero no las MCM5 y MCM6. La helicasa es un hexámero en forma de anillo (Brewster and Chen, 2010), encargado de la formación del origen de replicación, puesto que rompe los puentes de hidrógeno de la doble hélice permitiendo abrir las hebras y el avance de la horquilla. Otras proteínas de la horquilla de replicación encontradas pero no enriquecidas fueron la ADN Topoisomerasa II, que relaja la tensión provocada por el superenrollamiento del ADN al abrirse las dos hebras, la proteína RFA (replication factor A), encargada de unirse al ADN de cadena sencilla para mantenerlo desenrollado y permitir la acción de la polimerasa, y la proteína PCNA (proliferating cell nuclear antigen), que abraza al ADN reclutando proteínas implicadas en la replicación, reparación del ADN y remodelación de la cromatina. Además de esto, entre las proteínas encontradas con péptidos ubiquitinados (Tabla 3.1) estaba una proteína que podría estar relacionada con la replicación, la ADN helicasa ATP-dependiente UVRD, lo que confirma la implicación del UPS en dicho proceso.

En eucariotas, todas estas proteínas se han visto estar reguladas por el UPS de diferentes maneras, ya que éste juega un papel esencial en el ciclo celular y el proceso de la replicación y la reparación del ADN. Existen múltiples ejemplos de ello. Por ejemplo en *Xenopus laevis* la poliubiquitinación de la MCM7 del complejo helicasa durante la fase S es esencial para el término de la replicación. Esta poliubiquitinación parece estar mediada por E3 ligasas de la familia de las cullinas, que poliubiquitinan la MCM7 con cadenas de tipo K48, pero de forma independiente de la degradación por el proteasoma (Moreno et al., 2014). En levaduras también se ha observado algo similar. Se ha visto que la E3 ligasa SCF^{dia2} lleva a la ubiquitinación de MCM7 produciendo la terminación del replisoma (Maric et al., 2014; Bailey et al., 2015). Se piensa que este mecanismo está

conservado en eucariotas, y que podría ser llevado a cabo por alguna de las cullinas existentes (Cullina 1, 2, 3, 4A, 4B, 5 y 7) (Bailey et al., 2015).

La regulación de la Topoisomerasa II también podría estar mediada por el UPS. Las topoisomerasas eucariotas sufren múltiples modificaciones postraduccionales como la ubiquitinación, que alteran su localización y actividad a lo largo del ciclo celular, incluyendo los tipos de estructuras de ADN sobre las cuales actuar (Mao et al., 2001). Para poder llevar a cabo su función, la Topoisomerasa genera rupturas en una de las hebras del ADN para permitir su rotación, y tras esto liga la región cortada restableciendo la doble cadena. Durante este proceso, pueden generarse formas intermedias ADN/Topoisomerasa llamados complejos de ruptura que pueden dar lugar a la apoptosis. El UPS está implicado en la reparación de dichos complejos, ya que los reconoce eliminando la Topoisomerasa II y permitiendo que las rupturas de la cadena de ADN queden visibles y puedan ser reconocidas por el sistema de reparación del ADN (Mao et al., 2001). Por otro lado, DUBs como OTUD3 también están implicadas en la estabilidad de la Topoisomerasa II. La unión de la proteína supresora de tumores PTEN a la Topoisomerasa II lleva a su des-ubiquitinación por OTUD3, lo que la estabiliza permitiendo que pueda llevar a cabo la separación de las cadenas de ADN durante la mitosis (Kang et al., 2015).

En cuanto a la proteína RPA es una de las proteínas implicadas en la respuesta a daño en el ADN, funcionando como una proteína andamio a la que se unen otras proteínas. Tras el bloqueo de la horquilla de replicación se produce la ubiquitinación de RPA mediante la E3 ligasa RFWD3. Dicha ubiquitinación no lleva a la degradación por el proteasoma, sino que podría estar implicada en la reparación de la horquilla (Elia et al., 2015). La reparación al daño del ADN está también regulada a través de distintos mecanismos de ubiquitinación de la proteína PCNA. Por ejemplo en levaduras, la monoubiquitinación de PCNA por la E3 ligasa RAD18 y la E2 RAD6 lleva al reclutamiento polimerasas de la familia Y como la Pol η a través de sus dominios UBDs (Stelter and Ulrich, 2003), que lleva a la circunvalación de la lesión (Lehmann, 2011).

Con el objetivo de ver las proteínas que podrían estar implicadas en la regulación de la vía de la replicación en *P. falciparum*, el software IPA integró las

proteínas encontradas en nuestro estudio con la vía de replicación y ciclo celular, en base a interacciones descritas previamente en la bibliografía en el humano (Figura 3.7B). En color rojo se muestran las proteínas con una mayor presencia en el estudio, mientras que las proteínas ausentes están en color blanco. Algunas de las proteínas consideradas son chaperonas, como la CCT8 y DNAJB5, proteína homóloga a las HSP40s humanas. Otras proteínas de interacción pertenecen al UPS, incluyendo homólogos de las E3 ligasas HUWE1 (UPL1 en el parásito, Figura 3.6), UBE4A (UB4B en el parásito, Figura 3.6), UBR3 (AARP1 en el parásito, Figura 3.6), TRIP12, RNF115, Cullina 3 (Cullina 1 en el parásito, Figura 3.6), las proteínas satélites Ubiquilina 1 y 4, y la DUB FAM188A (putative uncharacterized protein PFF1485w en *P. falciparum*), todas ellas enriquecidas en la etapa de esquizonte.

La Cullina 3 (Cullina 1 en *P. falciparum*) podría ser la responsable directa de la ubiquitinación de las MCMs enriquecidas en este estudio, regulando la replicación y la progresión de la fase S como en otros organismos (Craney and Rape, 2013). El resto de proteínas del UPS nombradas también se han visto implicadas en el humano en la regulación de la vía de replicación, daño al ADN o ciclo celular. Por ejemplo, la E3 ligasa HUWE1 (UPL1 en el parásito), tiene un papel central en la regulación de la proliferación celular y apoptosis, regulando entre otras cosas los niveles de la proteína p53 (Brooks and Gu, 2006). Está implicada en la reparación del ADN, produciendo la degradación de proteínas control como CDC6 (Hall et al., 2007), el factor de recombinación homóloga BRCA1 (Wang et al., 2014) y las polimerasas de reparación por escisión β y λ (Parsons et al., 2009). HUWE1 también es responsable de la preservación de la estabilidad genómica mediante su interacción con PCNA y la monoubiquitinación de H2AX, que lleva al reclutamiento del complejo de reparación para reparar y/o reiniciar la horquilla de replicación dañada (Choe et al., 2016).

Las E3 ligasas UBR3 y TRIP12 son otras ligasas implicadas en la respuesta al daño en el ADN y apoptosis. TRIP12 produce la ubiquitinación de la DUB USP7, proteína reguladora clave de p53 (Liu et al., 2016) y produce la degradación de proteínas como la isoforma p19ARF/ARF de CDKN2A, requerida para la activación de p53/TP53 (Chen et al., 2010). En cuanto al mecanismo de UBR3 (llamada AARP1 en *P. falciparum*) aún no está totalmente elucidado. En *Drosophila* parece

estar implicado en la regulación de DIAP1, proteína requerida para prevenir la activación de las caspasas (Huang et al., 2014), mientras que en humano se ha visto que regula APE-1, proteína esencial para la reparación del daño al ADN y regulación de la transcripción (Meisenberg et al., 2012).

El papel de la E3 ligasa RNF115 en la proliferación celular tampoco es muy conocido. Tiene un papel en el tráfico de proteínas intracelular e interactúa con p21 promoviendo su degradación. La disminución del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina p21WAF/CIP1 lleva a un incremento de la proliferación celular (Wang et al., 2013). Otra de las proteínas consideradas por IPA fue la DUB FAM188A. Dicha proteína no está dentro de la Figura 3.6, puesto que en *P. falciparum* está descrita como una proteína putativa no caracterizada. La función de esta proteína parece ser proapoptótica ya que tiene un dominio CARD que permite el reclutamiento de caspasas. Mediante estudios de dos híbridos en levadura se ha visto que podría interaccionar con RAD23, pudiendo estar implicada en la reparación al daño de ADN (Rolland et al., 2014).

Otras proteínas del UPS que podrían estar implicadas en la vía del ciclo celular y replicación del ADN del parásito, son algunas proteínas del UPS humanas identificadas, ya que en el eritrocito no se lleva a cabo la replicación del ADN. La E3 ligasa humana RNF123 forma parte del complejo KPC que media la degradación del inhibidor de kinasas dependiente de ciclina p27 durante la fase G1 del ciclo celular (Kamura et al., 2004). Por su parte la USP5 humana regula p53/TP53, activando p53 (Dayal et al., 2009). Se ha descrito que virus como el Epstein-Barr producen un incremento de USPs como USP5, 7, 9, 13, 15 y 22 en linfocitos T y B para así incrementar su proliferación (Ovaa et al., 2004).

b) Estrés oxidativo mediado por NRF2.

El papel de la vía NRF2 en la malaria ha sido comentado anteriormente. En este caso, IPA consideró como enriquecida la vía NRF2 debido a la presencia de proteínas como las HSP40s Q8I0U6, PFE0055c y PF08_0032, ortólogas de las DNAJB5, DNAJB4 y DNAJC10 humanas respectivamente (Jacobs and Marnett, 2007). Además se identificó como proteína enriquecida la proteína del parásito

Q8IAU5, homóloga a la E3 ligasa Cullina 3 humana (Cullina 1 en *P. falciparum*), implicada en la regulación del factor NRF2. La vía NRF2 podría estar relacionada con el mecanismo de resistencia de antimaláricos como la Artemisinina (Figura D.4), aunque no se ha encontrado un ortólogo de NRF2 en *P. falciparum*. Mutaciones en la proteína KELCH13, homólogo de KEAP1 en humano, confieren resistencia a dicho antimalárico (Ariey et al., 2014). Aunque la función de KELCH13 no es conocida, debido a su homología con KEAP1 se piensa que en ausencia de estrés oxidativo estaría uniendo a la Cullina 3 y a un factor de transcripción similar a NRF2, produciendo la degradación de NRF2 por el proteasoma (Itoh et al., 2003; Itoh et al., 1997).

El mecanismo de acción de las Artemisininas y sus derivados no ha sido totalmente elucidado, sin embargo hay evidencias de que éstas funcionan como prodrogas que se activan al abrir el anillo endoperóxido que contienen (Li and Zhou, 2010). Una vez activadas, se piensa que forman radicales libres que reaccionan con las proteínas del parásito y con otros componentes celulares, llevando así a la muerte del parásito. El daño proteico podría estar iniciando la respuesta frente al estrés oxidativo a través del UPS, favoreciendo la supervivencia del parásito y produciéndose la muerte tan solo cuando el daño superase al UPS. En el caso de los mutantes KELCH13, la respuesta de dicho sistema sería más efectiva y por tanto el parásito tendría más opciones de poder sobrevivir (Winzeler and Manary, 2014) (Figura D.4). A favor de éste modelo se ha visto una acumulación de proteínas ubiquitinadas tras el tratamiento con Artemisinina. Además, se han visto sinergias *in vivo* e *in vitro*, por ejemplo entre la DHA con los inhibidores de proteasoma Epoxomicina, Carlfizomib y Bortezomib, habiendo una sinergia mayor en los mutantes KELCH13 (Neto et al., 2013). La sinergia con inhibidores de proteasoma ha sido también confirmada en ratones (Dogovski et al., 2015).

La inhibición del proteasoma podría estar incrementando la muerte del parásito al disminuir la respuesta a estrés, haciendo de nuevo al proteasoma una diana terapéutica atractiva para dar en combinación con otros antimaláricos. El análisis de parásitos *P. falciparum* aislados de pacientes con malaria aguda y resistentes a Artemisinina también ha mostrado tener incrementada la expresión

del sistema de respuesta a estrés endoplasmático frente a proteínas mal plegadas (unfolded protein response UPR), para mitigar el daño en las proteínas causado por Artemisinina. Dicho sistema está regulado a través del UPS (Mok et al., 2015).

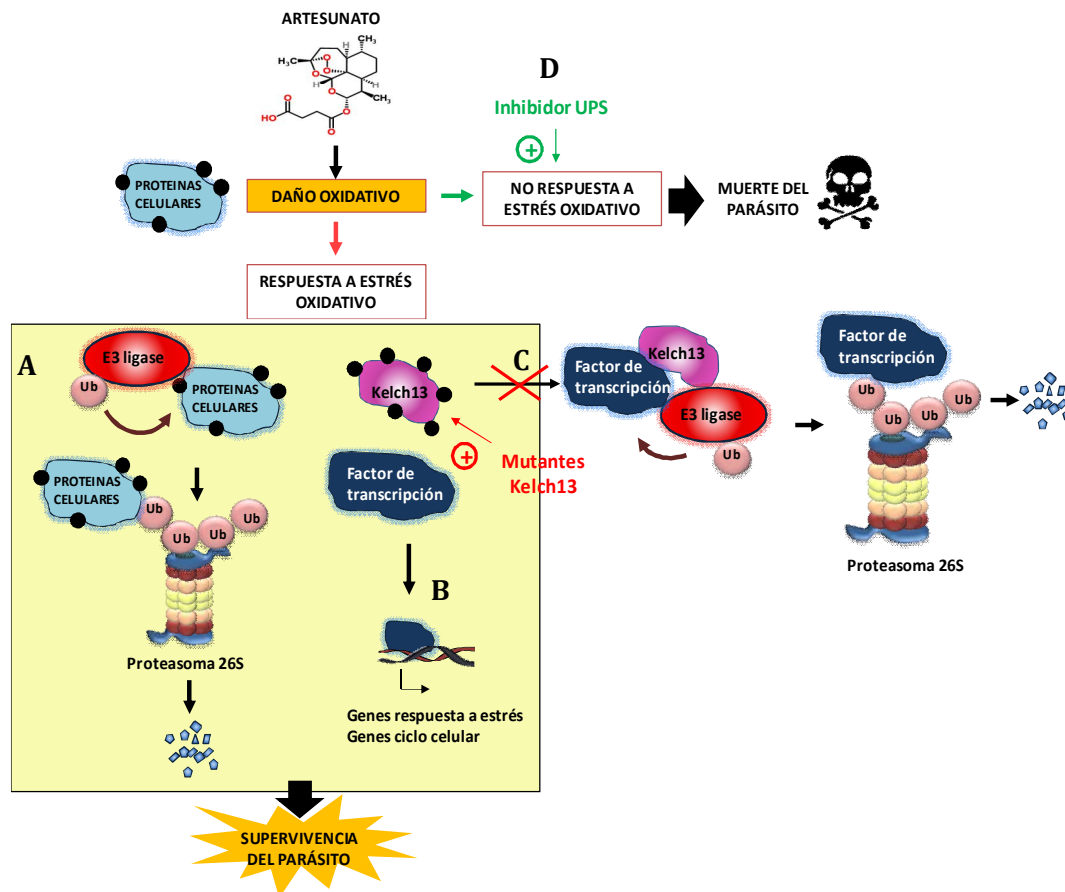


Figura D. 4. Mecanismo de acción propuesto para los compuestos derivados de la Artemisinina, y su relación con la respuesta a estrés oxidativo y el UPS. Tras el tratamiento, el Artesunato formaría radicales libres, generando un daño oxidativo que de no verse compensado llevaría a la muerte del parásito. El parásito posee varios sistemas de respuesta a estrés mediados por el UPS. **A.** las proteínas dañadas podrían ser reconocidas por chaperonas que llevan a su degradación por el proteasoma. **B.** En presencia de estrés oxidativo la proteína KELCH13 no uniría al factor de transcripción NRF2 y su E3 ligasa. NRF2 no sería degradado por el proteasoma, incrementando la expresión de genes antioxidantes. **C.** Los parásitos resistentes KELCH13 podrían estar favoreciendo la respuesta NRF2, compensando el daño oxidativo y por tanto la supervivencia. **D.** Los inhibidores del UPS podrían estar inhibiendo la respuesta a estrés oxidativo, incrementando la acción del Artesunato.

c) Sistema de transporte de proteínas y secreción Maurer's cleft

Una de las mayores aportaciones de este trabajo fue la identificación de la implicación del UPS en el sistema de secreción *Maurer's cleft*, y por tanto en la remodelación del eritrocito. En principio, el eritrocito carece de la maquinaria necesaria para la síntesis de lípidos y proteínas, así como para el transporte de los mismos. Además, la mayor fuente de nutrientes, la hemoglobina, no posee isoleucina y los aminoácidos cisteína, glutamato, metionina, prolina y tirosina son limitados (Divo et al., 1985). Todo esto lleva a que el parásito necesite establecer una nueva vía de permeabilidad en la membrana del eritrocito, a través de canales para importar nutrientes e intercambiar productos de desecho (Nguitrangolo et al., 2011; Mundwiler-Pachlatko and Beck, 2013). Tras la invasión, se inician una serie de eventos que llevan a cambios en los lípidos de la membrana plasmática eritrocítica y en algunas proteínas del hospedador así como en las características de adhesión en el eritrocito (Murphy et al., 2007; Culvenor et al., 1991; Vincensini et al., 2008).

Así, el parásito establece un complejo sistema de transporte de proteínas, creando nuevas estructuras membranosas entre la membrana externa de la vacuola parasitófora y el citosol y la membrana plasmática del eritrocito. Dicho sistema de transporte es lo que se ha llamado red tubo-vacuolar (Elford et al., 1995), y es utilizado no solo para adquirir los nutrientes desde el eritrocito, sino también para exportar sus propias proteínas hacia localizaciones subcelulares, a la membrana plasmática del eritrocito o al medio extracelular (Craig and Scherf, 2001; Cooke et al., 2004; Ginsburg and Stein, 2004). Se ha descrito que más de 300 proteínas de *P. falciparum*, contienen un motivo (RxLxE/D/Q) de transporte de proteínas llamado PEXEL (protein export element) (Marti et al., 2004), característico de la mayoría de las proteínas transportadas (Rug and Maier, 2011; Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). La manera por la cual dicho motivo media el transporte continúa siendo desconocido, pero podría implicar varios tipos de transporte, a través de la vía tradicional RE-Golgi (Gormley et al., 1992) o a través de rutas alternativas (Wiser et al., 1997). Además del RE y el Golgi, el sistema incluye una serie de estructuras endomembranas, los *Maurer's clefts*, las

vesículas electro-densas, y los *J-dots*. La función de las vesículas electro-densas y *J-dots* aún es desconocida (Lanzer et al., 2006; Tilley et al., 2008) (Figura 3.3).

Los *Maurer's clefts*, son estructuras membranosas aplanadas que surgen en la etapa de anillo temprano a partir de la vacuola parasitófora, y que en la etapa de trofozoito migran hacia la membrana del eritrocito. A pesar de que parece no haber conectividad con otros compartimentos, parece ser que estas estructuras funcionan como un orgánulo especializado en la secreción de proteínas, ya que son esenciales para su transporte desde el interior del parásito hacia la membrana interna y externa del eritrocito (Przyborski et al., 2003; Wickert et al., 2004; Hanssen et al., 2008; Waterkeyn et al., 2000; Wickham et al., 2001). Ninguna de las proteínas asociadas a los *Maurer's cleft* son homólogas a los mediadores de fusión y fisión utilizados por otros eucariotas superiores para el transporte de proteínas. Su formación y estructura es controlada gracias a las proteínas REX1 (ring exported protein 1), MAHRP1 (membrane-associated His-rich protein 1) y *Pf*SBP1 (*P. falciparum* skeleton binding protein 1). Varios estudios han revelado que un alto porcentaje de las proteínas exportadas hacia la superficie través de los *Maurer's clefts*, están implicadas en la formación de los *Knobs* (Cooke et al., 2006; Maier et al., 2007; Glenister et al., 2009), aunque el mecanismo de transporte y los componentes implicados en dicho proceso aún son desconocidos (Figura 3.3).

Los *Knobs* son protusiones electro-densas (Deitsch and Wellem, 1996) producidas por el parásito, y formadas principalmente por las proteínas *Pf*EMP1 y la cochaperona HSP40 KAHRP (knob-associated histidine-rich protein). Estas estructuras están localizadas bajo la membrana plasmática del eritrocito infectado maduro, y su función es anclar los eritrocitos infectados a las células endoteliales de los vasos sanguíneos para evadir su eliminación por fagocitosis en el bazo. La citoadherencia se produce gracias a la interacción de la proteína de membrana del eritrocito *Pf*EMP1 con las proteínas CD36, ICAM-1 y Chondroitin del hospedador. La proteína *Pf*EMP1 está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes en la malaria. La variación antigénica de *Pf*EMP1 (60 genes *var*) permite la evasión del sistema inmune y contribuye a la severidad de la infección (Arnot and Jensen, 2011). La proteína *Pf*EMP1 interacciona a través de su dominio

citoplasmático con la KAHRP, la cual interacciona a su vez con la espectrina, una proteína del citoesqueleto del eritrocito (Figura 3.3).

Otras proteínas del parásito, como PfEMP3 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3) y la cochaperona HSP40 RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen), también se unen a la espectrina para estabilizar el citoesqueleto de la membrana en etapas maduras de la infección (Figura 3.3) (Foley et al., 1990). Por ejemplo, RESA protege el citoesqueleto del daño producido por el calor durante los episodios de fiebre (Da Silva et al., 1994), y mantiene la deformabilidad de los parásitos en fases tempranas hasta que la citoadherencia previene el paso del eritrocito por el bazo (Mills et al., 2007). Otras proteínas del sistema *Maurer's cleft* son Pf332 y la cochaperona HSP40 MESA (mature-parasite-infected erythrocyte surface antigen) (Coppel et al., 1988). Ambas proteínas se unen al complejo de unión que une los heterodímeros de espectrina, ayudando a la formación de los *Knobs*.

En este trabajo se han encontrado la mayoría de las proteínas del parásito anteriormente descritas, implicadas en la formación de *Knobs* y en el sistema *Maurer's cleft*, resaltando la importancia del UPS en su regulación (Tabla 3.S2). Algunas de ellas como la PfSBP1, el antígeno 332, REX1 y RESA, fueron además consideradas como enriquecidas. Otras como PfEMP3, PfMC-2TM, KAHRP, MARHP2 and MESA fueron identificadas pero no cumplieron con los criterios de selección. A pesar de ello, PfEMP3, KAHRP y MARHP2 fueron algunas de las proteínas comunes con el análisis de *Ponts et al.* (Ponts et al., 2011). El hecho de que no se identificasen en la copurificación con el proteasoma de *Wang et al* podría indicar que la ubiquitinación podría tener un papel distinto a la degradación por el proteasoma.

REX1 fue una de las proteínas ubiquitinadas más destacadas encontradas en el análisis por MS (Figura 3.3). Se encontraron péptidos ubiquitinados en la etapa de trofozoito y su ubiquitinación fue confirmada por estudios de Western blot, ya que se encontraron formas de alto peso molecular en la etapa de trofozoito.

En la Tabla 3.S2 se muestran además otras de las muchas proteínas relacionadas previamente con el transporte de proteínas (61 proteínas), aunque la mayoría consideradas como no enriquecidas. Muchas de ellas poseen funciones desconocidas y/o contienen el dominio PEXEL previamente comentado. Entre las proteínas no enriquecidas está la proteína clatrina y la SNARE, de la vía de endocitosis mediada por clatrina. En otros parásitos apicomplexa como *Toxoplasma gondii*, se ha especulado que la endocitosis depende exclusivamente de esta vía, teniendo un papel esencial en la organización del aparato de Golgi y en el transporte de vesículas (Pieperhoff et al., 2013). En *P. falciparum* poco se sabe acerca de éste mecanismo. Por ejemplo, la internalización de la hemoglobina está mediada por citostomas (Yayon et al., 1984). Los citostomas son invaginaciones de doble membrana, que forman vesículas que se fusionan con la vacuola digestiva, de manera similar a la vía endocítica mediada por clatrina en mamíferos (Lazarus et al., 2008). Otro de los genes responsables de la resistencia frente a la Artemisinina es la proteína adaptadora AP2 (Henriques et al., 2015). Debido a que la Artemisinina parece interaccionar con el transporte de la hemoglobina (Klonis et al., 2011) y la vía endocítica, podría ser que la clatrina jugase un papel durante el consumo de la hemoglobina, y que el UPS regulase el proceso. La proteína E3 ligasa RNF115 encontrada en este estudio, está relacionada con el tráfico de endosomas, pudiendo tener un papel en esta función (Smith et al., 2013).

Muchas de las proteínas encontradas relacionadas con el transporte de proteínas fueron chaperonas (Tabla 3.S2) (Rug and Maier, 2011). Las chaperonas tienen un papel fundamental en la patogénesis de la malaria, ya que están implicadas en el transporte de proteínas, y tienen un papel frente al estrés producido por la fluctuación de temperatura durante las fiebres y la detoxificación del grupo hemo. En *P. falciparum* se ha visto que el 2% de los genes codifican chaperonas, teniendo una gran relevancia la familia de cochaperonas HSP40 (Das et al., 1997). Aunque en otros organismos la respuesta de las chaperonas está controlada transcripcionalmente por el factor de transcripción HSF1 (ver discusión sección 5.3.3. B), en *Plasmodium* no se ha encontrado ningún ortólogo de dicho factor.

Además de su función en la regulación de la actividad de las chaperonas HSP70, las HSP40s están implicadas en la inhibición de la agregación proteica y en el ensamblaje de complejos (Walsh et al., 2004; Bao et al., 2002), así como en la virulencia de algunos patógenos como *Streptococcus pneumoniae* (Cai et al., 2013). En *P. falciparum* se han encontrado un total de 43 HSP40s. 31 de ellas poseen el dominio J, agrupándose en tres grupos. El grupo I y II, que en otros sistemas eucariotas se unen y liberan el sustrato a las HSP70s, y el grupo III, que recluta HSP70s a localizaciones intracelulares específicas para plegar sus sustratos. El resto de HSP40s se agrupan de forma independiente en un cuarto grupo, cuya función es poco conocida al no poseer ortólogos humanos (Rug and Maier, 2011).

Estudio de “dos híbridos” en levaduras han mostrado que las HSP40s del parásito podrían interactuar con el citoesqueleto, con proteínas de membrana, la maquinaria de transcripción y traducción, reparación y replicación de ADN, proteasoma y enzimas proteolíticas, y enzimas implicadas en metabolismo y fosforilación (Botha et al., 2007), regulando todos estos procesos. Existen evidencias de la interacción del UPS con las chaperonas del parásito. Por ejemplo, se ha visto que la chaperona DNAJ PFF1415c podría estar interactuando con la subunidad del proteasoma RPN2 (PF14_0632), ambas proteínas encontradas como enriquecidas en nuestro trabajo (Botha et al., 2007). Además, se observaron altas formas de peso molecular en el análisis por Western blot con un anticuerpo específico de *P. falciparum* frente a la chaperona HSP40 DNAJB1 (PF11_0513), señalando su posible ubiquitinación.

Se han encontrado numerosas evidencias de la relación de las chaperonas con el sistema *Maurer's cleft* y el transporte de proteínas (Nyalwidhe and Lingelbach, 2006; Lanzer et al., 2006). En *P. falciparum*, 18 de las HSP40s encontradas poseen el dominio de transporte PEXEL, siendo el número de proteínas exportadas HSP40 predichas mucho mayor que en otras especies (Sargeant et al., 2006). La presencia de alguna de ellas en el citoplasma del hospedador ha sido confirmada experimentalmente (Silva et al., 2005; Bhattacharjee et al., 2008; Kulzer et al., 2010). El complejo proceso de remodelación y transporte requiere de un extensa translocación, plegado, ensamblaje y desensamblaje de proteínas que podrían

requerir la acción de chaperonas (Gehde et al., 2009). Sin embargo este proceso representa un paradigma dentro de la biología del parásito.

En este trabajo se han encontrado dos HS40s con motivos PEXEL pertenecientes al grupo II (PFB0090c, PFE0055c), aunque solo la PFE0055c fue considerada como enriquecida (Tabla 3.S1 y 3.S2). La localización de la PFE0055c en el citoplasma del eritrocito ha sido confirmada previamente, colocándola además con la proteína *Maurer's cleft* PfSBP1, y con las estructuras *J-dots* (Bhattacharjee et al., 2008). En cuanto a la proteína PFB0090c se ha visto que interacciona con componentes de los *Knobs* (KAHRP, PfEMP3 y PfEMP1) (Acharya et al., 2012). Estas chaperonas poseen homología con la chaperona humana DNAJB4, la cual se ha visto interaccionar con HSP70s. Sin embargo, ninguna de las seis HSP70s encontradas en *P. falciparum* poseen un dominio de exportación. Tan solo la PfHSP70-1 (PF08_0054) y PfHSP70-3 (PF11_0351) han sido previamente detectadas fuera de la vacuola parasitófora del parásito, pudiendo estar implicadas en la translocación de proteínas en la membrana parasitófora (Nyalwidhe and Lingelbach, 2006). Ambas HSP70s fueron encontradas en este estudio, en *Ponts et al.* y *Wang et al.*, aunque fueron consideradas como no enriquecidas. Existe la hipótesis de que el parásito podría estar manipulando y utilizando las HSP70 del hospedador en el citosol, en consonancia con las PfHSP40s (Banumathy et al., 2002; Charpian and Przyborski, 2008; Kulzer et al., 2010). Hay evidencias que sugieren que las HSP70 del parásito podrían permanecer en la vacuola parasitófora y los *Maurer's cleft*, mediando la translocación de proteínas a transportar, pero que una vez las proteínas son liberadas, las HSP40s las capturarían y entregarían a HSP70s humanas en el citosol del eritrocito, para su plegado y ensamblaje (Botha et al., 2007).

Las HSP40s de tipo IV son las que tienen un mayor número de proteínas con el dominio PEXEL (83%), pudiendo ser esenciales para el remodelado del hospedador. Este grupo de cochaperonas han perdido el dominio J característico de las HSP40s, por lo que no se sabe cómo podrían estar funcionando. Se ha especulado que una posible función podría ser el modular las HSP70 humanas, y que sus miembros podrían estar implicados en mantener la integridad y modular el eritrocito infectado (Walsh et al., 2004), ya que entre estas proteínas se

encuentran por ejemplo las proteínas del sistema *Maurer's cleft* ya comentadas, RESA, MESA y KAHRP. Esta última proteína además co-fracciona con chaperonas humanas HSP70 en las fracciones correspondientes a los *Knobs*, indicando que estas HSP40s podrían ser reclutadas en la membrana para ayudar a su ensamblaje (Banumathy et al., 2002).

Por otro lado, además del sistema *Maurer's cleft*, otras chaperonas HSP40s encontradas, como la PF11-0099 (ERDJ5) del grupo II, tienen similaridad con proteínas humanas implicadas en el sistema de degradación en el retículo endoplasmático (ERAD) regulado por el UPS. Los componentes del sistema ERAD en el parásito son menores que en el humano. La proteína E3 ligasa UBE4B mostrada en la Figura 1.20 está entre una de las proteínas enriquecidas identificadas en este estudio. Aunque no está dentro de las proteínas consideradas como enriquecidas, la proteína conjugadora de ubiquitina E1 *PfUBA1* identificada por *Ponts et al*, ha sido también encontrada en este trabajo. Por otro lado, en humanos se ha visto que la chaperona HSP70 GRP78/BIP está asociada al sistema ERAD, jugando un papel esencial en el reconocimiento de las proteínas dañadas y regulando la respuesta a proteínas mal plegadas UPR. En *P. falciparum*, estudios de levaduras de doble híbrido (Botha et al., 2007), han mostrado que la *PfBIP* podría interaccionar con la chaperona HSP40 PFL0815, identificada en este estudio, teniendo una proteína de interacción común, la proteína del UPS RAD23. Otra proteína de interacción con *PfBIP* encontrada fue la chaperona PFB0595w, también identificada y con una proteína de interacción común, la UPL1. Dicha E3 ligasa, homóloga de la HUWE1 humana, está entre las proteínas enriquecidas de nuestro estudio (Figura 3.6), pudiendo estar también implicada en la regulación del ERAD en *P. falciparum* entre otras funciones. En los estudio de Western blot realizados se pudo observar un incremento en altas formas de peso molecular en la proteína UPL1 (Figura 3.6) de *P. falciparum*, que podría corresponder a su autoubiquitinación en etapas tardías de la infección.

5.4. CAPÍTULO 4. Establecimiento de dos métodos de HTS para cuantificar los niveles de proteínas ubiquitinadas en lisados celulares: Aplicación para la búsqueda de nuevos antimaláricos.

El número de dianas terapéuticas en *P. falciparum* es aún escaso, siendo el UPS una de las pocas dianas validadas químicamente. Actualmente, la mayoría de los esfuerzos para la búsqueda de nuevos antimaláricos dentro del UPS, está centrada en la búsqueda de inhibidores del proteasoma específicos de *P. falciparum*, ya que se ha visto que los inhibidores de proteasoma pueden tener diferencias de selectividad por subunidad entre el proteasoma humano y el del parásito (Li et al., 2014). A pesar de ello, debido a su posible toxicidad, se han considerado otras posibles dianas terapéuticas dentro del UPS, las ligasas y las DUBs, ya que poseen una menor homología con sus ortólogos humanos. La toxicidad derivada de la inhibición de la degradación de todas las proteínas ubiquitinadas en su conjunto puede ser evitada, ya que la inhibición de ligasas o DUBs específicas lleva a la inhibición de la degradación de un conjunto de proteínas más seleccionado. Sin embargo, existe una falta de conocimiento del UPS, y de ligasas y DUBs bien validadas para llevar a cabo campañas de HTS basadas en diana. Actualmente no se ha validado aún ninguna E3 ligasa de *P. falciparum* como esencial y en cuanto a las DUBs, tan solo la *PfUCL3* (Artavanis-Tsakonas et al., 2010) y la *PfUSP14* (Wang et al., 2015) han sido estudiadas.

La cuantificación de los niveles globales de proteínas ubiquitinadas tras un tratamiento con inhibidores, permite identificar compuestos que inhiban cualquiera de los componentes del UPS. Permite detectar no solo inhibidores de proteasoma, sino también inhibidores de DUBs o ligasas, que alteren suficientemente los niveles de proteínas ubiquitinadas respecto a los niveles basales, sin necesidad de una validación previa y de su expresión para llevar a cabo ensayos bioquímicos. Tanto inhibidores de DUBs o proteasoma, como activadores de las enzimas E1, E2 conjugadoras o E3 ligasas, pueden dar lugar a una acumulación de proteínas ubiquitinadas. Una disminución de proteínas ubiquitinadas podría darse en el caso contrario. Los cambios en los niveles de

ubiquitinación pueden ser diferentes dependiendo de la cantidad de sustratos regulados por la diana afectada.

El ensayo estándar para medir acumulación de proteínas ubiquitinadas es el Western blot, utilizándose anticuerpos específicos de proteínas reguladas por el proteasoma o un anticuerpo anti-ubiquitina. Sin embargo, la principal desventaja de este ensayo es que no permite ensayar un gran número de compuestos. Por ello, para incrementar la cantidad de compuestos a ensayar y poder realizar campañas de HTS e identificar compuestos que alteren los niveles de proteínas ubiquitinadas en las células, en este trabajo se han puesto a punto dos ensayos diferentes. Dichos ensayos utilizan las TUBEs, puesto que es una herramienta específica y económica, lo que es importante para ensayar un alto número de compuestos.

El primer ensayo desarrollado fue un ensayo homogéneo de AlphaLISA (Figura I.17 y Figura 4.2A) en un formato de 1536 pocillos, mientras que el segundo ensayo desarrollado, el DELFIA (Figura 4.2B), es un ensayo heterogéneo llevado a cabo en placas de 384 pocillos. En este último ensayo, tanto el compuesto, como aquellos componentes del extracto celular no unidos a la trampa, son retirados del pocillo mediante diferentes ciclos de lavado, teniendo por tanto un menor porcentaje de falsos positivos y negativos. Además, en el ensayo heterogéneo la hemoglobina es retirada, evitando la interferencia que genera en la lectura. Debido a dicha interferencia, el rango de lectura en el cual puede observarse una diferencia entre los niveles de proteínas ubiquitinadas basales y los niveles en presencia de un inhibidor en el AlphaLISA se ve acotado.

En ambos ensayos se partió de eritrocitos infectados con esquizontes purificados al 100% de parasitemia (Pasos 1-4 Figura 1.4), ya que la acumulación de proteínas ubiquitinadas tras 1 hora de tratamiento con los inhibidores de proteasoma MG132 y Epoxomicina fue mayor en dicha etapa (Figura 4.1). Esto podría ser debido a que en la etapa de esquizonte la actividad del UPS es mayor, coincidiendo con la replicación, tal y como se describió en el capítulo 3. El tratamiento se llevó a cabo durante una hora debido a que a tiempos más largos, la acumulación de proteínas ubiquitinadas podría ser consecuencia de otros procesos secundarios, por ejemplo de un daño proteico generalizado.

Para cuantificar los niveles de proteínas ubiquitinadas presentes en las células, fue necesario liberarlas previamente mediante la lisis celular. En *P. falciparum*, este proceso requiere de condiciones más agresivas que en células de mamífero, por ejemplo la lisis por sonicación. Sin embargo, dicho proceso no era posible de realizar en placa. Por ello, se optimizó un nuevo método de lisis en placa, testándose diferentes detergentes y utilizando diferentes métodos de ruptura. La cantidad de proteína liberada fue cuantificada por Western blot con un anticuerpo anti-aldolasa, proteína específica del parásito. En ambos ensayos la lisis se realizó en presencia de las TUBEs, para proteger frente a la degradación por el proteasoma. Una vez liberadas, las proteínas ubiquitinadas fueron cuantificadas por alguno de los dos métodos establecidos, obteniendo una señal proporcional a la cantidad de proteínas ubiquitinadas presentes. La acumulación provenía de las proteínas ubiquitinadas del parásito, ya que los ensayos se realizaron en paralelo con eritrocitos sin infectar, no observándose diferencia alguna en presencia del inhibidor. Posiblemente esto sea debido a que en esquizontes el UPS del hospedador es muy poco activo (capítulo 3).

La puesta a punto de los ensayos no fue sencilla, ya que hubo que solventar varios problemas. En primer lugar, fue muy complicado dar con la combinación de componentes adecuada en el ensayo homogéneo, para obtener una señal específica. La tecnología HTRF es muy utilizada para llevar a cabo campañas de HTS. La ventaja de esta tecnología es que existe un retraso entre la excitación del lantánido y la emisión, que permite el decaimiento de la fluorescencia de los componentes, como compuestos o componentes del extracto, que pueden ser interferentes. Para ello se probaron numerosas combinaciones de componentes basados en esta tecnología. Por ejemplo, se probaron TUBEs marcadas con GST o biotina y distintos métodos de reconocimiento. Anticuerpos anti-GST o estreptavidina unidos a distintos fluoróforos, anticuerpos primarios anti-ubiquitina de diferentes fuentes marcados o no directamente con fluoróforos, anticuerpos secundarios marcados con distintos fluoróforos, diferentes tipos de cadenas de poliubiquitina, etc. Sin embargo, en ninguna de las numerosas combinaciones se obtuvo una señal específica, quizá porque la distancia entre los fluoróforos era demasiado grande, lo que no permitía la transferencia de energía.

El AlphaLISA por su parte, permite la detección de complejos más largos que el HTRF (Figura I.17). También se hubieron de testar diferentes combinaciones hasta dar con la combinación en la que se obtenía una señal específica (Figura 4.2A). Se probaron TUBEs marcadas con biotina y GST, bolas aceptoras y donadoras de reconocimiento a GST o de estreptavidina, distintos anticuerpos primarios anti-ubiquitina y bolas de proteína A donadoras y aceptoras. Todas estas pruebas fallidas, muestran la dificultad de establecer un método para detectar los niveles de proteínas ubiquitinadas de forma nativa y en un extracto celular. En el caso del DELFIA también se probaron distintas TUBEs (biotina o GST), anticuerpos y fluoróforos. Por ejemplo se probó a formar el sándwich con el anticuerpo anti-ubiquitina FK2 marcado con fluoresceína, y con anticuerpos secundarios marcados los fluoróforo Alexa 488 o D2. A pesar de que había cierta ventana, el mejor resultado fue obtenido con el anticuerpo secundario de DELFIA. Esta tecnología hace uso de las ventajas de los lantánidos ya comentadas anteriormente, y dada su sensibilidad, es utilizada para la determinación de distintas proteínas en sangre en diagnóstico clínico, por ejemplo en endocrinología (prolactina, HCG, FSH, cortisol etc.), en oncología (PSA, CEA, etc.), o en diagnóstico prenatal o neonatal (estriol, TSH etc.)

Para la optimización de ambos ensayos, cada uno de los componentes que conforman el sándwich, hubo de ser optimizado tal y como se describe en el capítulo 4. El orden de adición de cada uno de ellos, los volúmenes, los tiempos de incubación e incluso la temperatura, también fueron claves para maximizar la ventana obtenida. Tras dicha optimización, el ratio obtenido en presencia y ausencia de proteínas ubiquitinadas fue de alrededor de 17 veces. El ratio entre la cantidad de proteínas ubiquitinadas tras el tratamiento con el inhibidor y las presentes de forma basal es bajo en *P. falciparum* (alrededor de 1.5 veces en el Western blot Figura 4.1), dificultando la puesta a punto para campañas de HTS. Sin embargo, finalmente la robustez de ambos ensayos fue demostrada en los experimentos mostrados en la Figura 4.6.

Para evitar las desventajas que poseen los ensayos fenotípicos y los basados en diana, y preservar lo máximo posible las condiciones fisiológicas en las que se produce la inhibición, tanto el ensayo de AlphaLISA como el DELFIA son una

mezcla de ambas aproximaciones. Los inhibidores fueron incubados con las células y tras la lisis, las proteínas ubiquitinadas presentes en la célula fueron detectadas. Esto quiere decir, que tan solo los compuestos que hayan sido capaces de penetrar las membranas celulares podrán alterar de alguna manera los niveles globales. Si además producen la muerte del parásito, la potencia debe ser similar a la obtenida en el ensayo fenotípico como sucede con los inhibidores de proteasoma conocidos testados (Figura 4.5C). Por ello, hemos utilizado ambos ensayos para la realización de una campaña de HTS con los compuestos del TCAMs (Gamo et al., 2010), los cuales producen la inhibición del crecimiento del parásito (introducción 2.1.4.). El HTS se ha realizado con el ensayo de AlphaLISA, utilizándose el DELFIA como ensayo confirmatorio. Los resultados de dicho trabajo no se han incluido en esta tesis por ser necesaria la validación de los resultados obtenidos. Una vez se termine la validación, los resultados serán publicados.

La deconvolución de los compuestos que producen cambios en los niveles de proteínas ubiquitinadas, y además producen la muerte del parásito, puede llevar a la identificación de nuevas dianas terapéuticas dentro del UPS. Al estar acotada la diana a dicho sistema, la identificación es mucho más sencilla que en un ensayo basado en célula entera convencional. En el caso de que las estructuras no sean lo suficientemente novedosas o buenas para el desarrollo de un nuevo antimalárico, la identificación de compuestos que sirvan como herramienta (tool compound), para la validación química y la esencialidad de distintos componentes del UPS, también resulta de gran utilidad. Estos compuestos “tool compound”, pueden utilizarse para comprender mejor la biología de la diana, y para predecir los efectos de la inhibición y su nivel de toxicidad en la clínica. Por tanto, los resultados que pueden derivarse de los ensayos desarrollados van más allá del desarrollo de un nuevo fármaco, puesto que pueden también facilitar la identificación de nuevas dianas terapéuticas esenciales para el parásito que además están validadas químicamente, puesto que permiten la unión de compuestos.

Para la deconvolución e identificación de la diana de los compuestos obtenidos, pueden llevarse a cabo ensayos bioquímicos como los descritos en la introducción. Es de esperar que muchos de los compuestos identificados mediante

esta aproximación sean inhibidores de proteasoma, ya que su inhibición podría llevar a la acumulación de un mayor número de proteínas ubiquitinadas. Por ello un primer paso en la deconvolución sería por ejemplo utilizar un ensayo que mida la actividad del proteasoma de *P. falciparum* en presencia de dichos inhibidores (Figura I.14). La utilización de sondas químicas también puede ayudar a determinar las actividades del proteasoma que se ven alteradas tras la inhibición (Figura I.16).

El tratamiento con inhibidores de DUBs como el b-AP15 o el PR619, también llevan a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en extractos celulares. Las sondas químicas podrían ser también de gran ayuda para la identificación de las DUBs del parásito afectadas por un compuesto en particular (Figura I.18). Las proteínas correspondientes a las bandas afectadas tras la inhibición pueden ser identificadas por MS.

También podría darse el caso de identificar compuestos que producen una bajada en los niveles de proteínas ubiquitinadas. Estos podrían ser compuestos inhibidores de enzimas conjugadoras o de E3 ligasas que lleven a la ubiquitinación de un gran número de proteínas. Para su identificación, podrían realizarse por ejemplo ensayos de MS para detectar aquellas E3 ligasas cuya autoubiquitinación se haya visto afectada.

La deconvolución del modo de acción de compuestos identificados, o el estudio de algunas de las proteínas determinadas por MS en el capítulo 3, podría llevar a la identificación y validación de nuevas DUBs, enzimas conjugadoras o E3 ligasas del UPS. Esto podría dar lugar a nuevas campañas de HTS basadas en diana, para la identificación de nuevas estructuras. La idea de desarrollar los ensayos descritos de AlphaLISA y DELFIA, era también la de poder adaptar cualquiera de ellos a la identificación de los niveles de ubiquitinación de determinadas proteínas cambiando tan solo el anticuerpo primario. De esta manera podría determinarse la carga de ubiquitina tanto de ligasas como de substratos de ligasas y DUBs en un extracto celular, tal y como se ha comentado en la introducción (sección 2.2.3.2).

Aunque los ensayos de AlphaLISA y DELFIA desarrollados, están siendo utilizados para la identificación de nuevos antimaláricos, el UPS está implicado en

múltiples enfermedades. Por tanto, ambos ensayos pueden ser aplicados para la identificación de inhibidores en otras enfermedades, y todo lo comentado anteriormente aplicarse para el estudio de otros tipos celulares. Además, posiblemente en otros tipos celulares la aplicación sería mucho más sencilla, ya que no sería necesaria la sincronización y purificación de las células antes del tratamiento, y la hemoglobina no estaría presente durante la lectura, pudiendo quizá incrementar la señal o la ventana.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

- 1) Para obtener **cultivos de alta parasitemia** se ha puesto a punto un protocolo que combina la sincronización con percoll y sorbitol, la purificación mediante columnas magnéticas y la reducción del hematocrito. El método resultante es un método sencillo, rápido, reproducible y robusto que permite obtener parasitemias de alrededor del 40%.
- 2) Se ha establecido un **protocolo para la purificación de proteínas ubiquitinadas**, así como sus factores de interacción, para su análisis por MS. El método de enriquecimiento mediante las **TUBEs** unidas covalentemente a bolas de agarosa, ha sido clave para preservar el estado fisiológico de las muestras.
- 3) El **ubiquitoma de parásito y hospedador** en las diferentes etapas intraeritrocíticas fue obtenido utilizando los métodos previamente establecidos. El número de proteínas ubiquitinadas incrementó a lo largo del ciclo intraeritrocítico en el parásito, mientras que en el hospedador primero se incrementó y luego disminuyó con el ciclo de infección. El parásito podría estar llevando a una disminución de las funciones proteolíticas del hospedador.

La mayoría de las proteínas enriquecidas encontradas pertenecían al UPS, identificándose ligasas, DUBs y subunidades del proteasoma 19S y 20S.

Además, tras la infección los cambios más significativos en el ERITROCITO se produjeron en las vías de señalización de “plegamiento de proteínas”, “endocitosis mediada por clatrina” y “respuesta a estrés oxidativo mediado por la vía NRF2”, encontrándose proteínas reguladas por el UPS que se han visto modificadas por patógenos en otros sistemas celulares.

En *P. FALCIPARUM*, los cambios más significativos fueron “la replicación del ADN”, “la respuesta a estrés oxidativo mediado por NRF2” y “el transporte de proteínas y el sistema *Maurer's cleft*”. Por primera vez se ha descrito la implicación del UPS en la formación de *Knobs* y en la remodelación del eritrocito, pudiendo estar las chaperonas implicadas en este proceso.

- 4) Se han desarrollado **dos ensayos basados en las TUBEs para cuantificar los niveles de proteínas ubiquitinadas celulares** tras el tratamiento con compuestos. El objetivo es identificar nuevos inhibidores del UPS del parásito y/o nuevas dianas terapéuticas. Estos ensayos permiten identificar inhibidores de cualquiera de los componentes del sistema que alteren los niveles de las proteínas ubiquitinadas, sin la necesidad de una validación previa de la diana, permitiendo ensayar un gran número de compuestos. Podrían ser adaptados para la identificación de los niveles de ubiquitinación de determinadas proteínas cambiando tan solo el anticuerpo primario, o para el estudio de otras enfermedades distintas a la malaria.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abugo, O. O. & Rifkind, J. M. 1994. Oxidation of hemoglobin and the enhancement produced by nitroblue tetrazolium. *J Biol Chem*, 269, 24845-53.
- Acharya, P., Chaubey, S., Grover, M. & Tatu, U. 2012. An exported heat shock protein 40 associates with pathogenesis-related knobs in Plasmodium falciparum infected erythrocytes. *PLoS One*, 7, e44605.
- Ahn, S. G. & Thiele, D. J. 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev*, 17, 516-28.
- Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Hjerpe, R., Torres-Ramos, M., Lang, V. & Rodriguez, M. S. 2012. Isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *Methods Mol Biol*, 832, 173-83.
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I. & Sistonen, L. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 545-55.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. 1994. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem*, 115, 257-69.
- Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K. & Ichihara, A. 1994. Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett*, 343, 85-8.
- Al-Hakim, A. K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Pegg, M. & Alessi, D. R. 2008. Control of AMPK-related kinases by USP9X and atypical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, 411, 249-60.
- Alberti, S., Demand, J., Esser, C., Emmerich, N., Schild, H. & Hohfeld, J. 2002. Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem*, 277, 45920-7.
- Alomairi, J., Bonacci, T., Ghigo, E. & Soubeyran, P. 2015. Alterations of host cell ubiquitination machinery by pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, 5, 17.
- Altun, M., Kramer, H. B., Willems, L. I., Mcdermott, J. L., Leach, C. A., Goldenberg, S. J., Kumar, K. G., Konietzny, R., Fischer, R., Kogan, E., Mackeen, M. M., McGouran, J., Khoronenkova, S. V., Parsons, J. L., Dianov, G. L., Nicholson, B. & Kessler, B. M. 2011. Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chem Biol*, 18, 1401-12.
- Aly, A. S., Vaughan, A. M. & Kappe, S. H. 2009. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*, 63, 195-221.
- Aminake, M. N., Arndt, H. D. & Pradel, G. 2012. The proteasome of malaria parasites: A multi-stage drug target for chemotherapeutic intervention? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2, 1-10.
- Aminake, M. N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H. D. & Pradel, G. 2011. Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1338-48.
- Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A. C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., Lim, P., Leang, R., Duong, S., Sreng, S., Suon, S., Chuor, C. M., Bout, D. M., Menard, S., Rogers, W. O., Genton, B., Fandeur, T., Miotto, O., Ringwald, P., Le Bras, J., Berry, A., Barale, J. C., Fairhurst, R. M., Benoit-Vical, F., Mercereau-Puijalon, O. & Menard, D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature*, 505, 50-5.

- Arnot, D. E. & Jensen, A. T. 2011. Antigenic Variation and the Genetics and Epigenetics of the PfEMP1 Erythrocyte Surface Antigens in *Plasmodium falciparum* Malaria. *Adv Appl Microbiol*, 74, 77-96.
- Artavanis-Tsakonas, K., Misaghi, S., Comeaux, C. A., Catic, A., Spooner, E., Duraisingh, M. T. & Ploegh, H. L. 2006. Identification by functional proteomics of a deubiquitinating/deNeddylating enzyme in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 61, 1187-95.
- Artavanis-Tsakonas, K., Weihofen, W. A., Antos, J. M., Coleman, B. I., Comeaux, C. A., Duraisingh, M. T., Gaudet, R. & Ploegh, H. L. 2010. Characterization and structural studies of the *Plasmodium falciparum* ubiquitin and Nedd8 hydrolase UCHL3. *J Biol Chem*, 285, 6857-66.
- Ashida, H., Kim, M. & Sasakawa, C. 2014. Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 12, 399-413.
- Azkargorta, M., Escobes, I., Elortza, F., Matthiesen, R. & Rodriguez, M. S. 2016. TUBEs-Mass Spectrometry for Identification and Analysis of the Ubiquitin-Proteome. *Methods Mol Biol*, 1449, 177-92.
- Baer, K., Klotz, C., Kappe, S. H., Schnieder, T. & Frevert, U. 2007. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*, 3, e171.
- Bailey, R., Priego Moreno, S. & Gambus, A. 2015. Termination of DNA replication forks: "Breaking up is hard to do". *Nucleus*, 6, 187-96.
- Baird, J. K. 2005. Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med*, 352, 1565-77.
- Banumathy, G., Singh, V. & Tatu, U. 2002. Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 277, 3902-12.
- Bao, Y. P., Cook, L. J., O'donovan, D., Uyama, E. & Rubinsztein, D. C. 2002. Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Biol Chem*, 277, 12263-9.
- Bates, A. H., Mu, J., Jiang, H., Fairhurst, R. M. & Su, X. Z. 2010. Use of magnetically purified *Plasmodium falciparum* parasites improves the accuracy of erythrocyte invasion assays. *Exp Parasitol*, 126, 278-80.
- Batra, J., Tripathi, S., Kumar, A., Katz, J. M., Cox, N. J., Lal, R. B., Sambhara, S. & Lal, S. K. 2016. Human Heat shock protein 40 (Hsp40/DnaJB1) promotes influenza A virus replication by assisting nuclear import of viral ribonucleoproteins. *Sci Rep*, 6, 19063.
- Bautista, J. M., Marin-Garcia, P., Diez, A., Azcarate, I. G. & Puyet, A. 2014. Malaria proteomics: insights into the parasite-host interactions in the pathogenic space. *J Proteomics*, 97, 107-25.
- Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci*, 8, 921-9.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J. & Roelofs, J. 2010. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol*, 20, 391-401.
- Beers, E. P. & Callis, J. 1993. Utility of polyhistidine-tagged ubiquitin in the purification of ubiquitin-protein conjugates and as an affinity ligand for the purification of ubiquitin-specific hydrolases. *J Biol Chem*, 268, 21645-9.
- Bell, D., Peeling, R. W. & Pacific/Tdr, W. H.-R. O. F. T. W. 2006. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nat Rev Microbiol*, 4, S34-8.
- Berkers, C. R., Van Leeuwen, F. W., Groothuis, T. A., Peperzak, V., Van Tilburg, E. W., Borst, J., Neefjes, J. J. & Ovaa, H. 2007. Profiling proteasome activity in tissue with fluorescent probes. *Mol Pharm*, 4, 739-48.
- Bhattacharjee, S., Van Ooij, C., Balu, B., Adams, J. H. & Haldar, K. 2008. Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum* are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for delivery to the host erythrocyte. *Blood*, 111, 2418-26.

- Bhoj, V. G. & Chen, Z. J. 2009. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458, 430-7.
- Birsa, N., Norkett, R., Wauer, T., Mevissen, T. E., Wu, H. C., Foltynie, T., Bhatia, K., Hirst, W. D., Komander, D., Plun-Favreau, H. & Kittler, J. T. 2014. Lysine 27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the Parkin ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, 289, 14569-82.
- Borissenko, L. & Groll, M. 2007a. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev*, 107, 687-717.
- Borissenko, L. & Groll, M. 2007b. Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response. *Biol Chem*, 388, 947-55.
- Borodovsky, A., Ovaa, H., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K. D., Ploegh, H. L. & Kessler, B. M. 2002. Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol*, 9, 1149-59.
- Botha, M., Pesce, E. R. & Blatch, G. L. 2007. The Hsp40 proteins of *Plasmodium falciparum* and other apicomplexa: regulating chaperone power in the parasite and the host. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1781-803.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B. L., Wong, E. D., Zhu, J. & Derisi, J. L. 2003. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, 1, E5.
- Bray, P. G., Ward, S. A. & O'Neill, P. M. 2005. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Curr Top Microbiol Immunol*, 295, 3-38.
- Breman, J. G., Alilio, M. S. & Mills, A. 2004. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg*, 71, 1-15.
- Breman, J. G., Mills, A., Snow, R. W., Mulligan, J., Lengeler, C., Mendis, K., Sharp, B., Morel, C., Marchesini, P., White, N. J., Steketee, R. W. & Doumbo, O. K. 2006. Conquering Malaria. In: JAMISON D.T., B. J. G., MEASHAM A.R., ALLEYNE G., CLAESON M., EVANS D.B., JHA P., MILLS A. AND MUSGROVE P. (ed.) *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd ed.
- Brewster, A. S. & Chen, X. S. 2010. Insights into the MCM functional mechanism: lessons learned from the archaeal MCM complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45, 243-56.
- Brooks, C. L. & Gu, W. 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell*, 21, 307-15.
- Burns, E. R. & Pollack, S. 1988. *P. falciparum* infected erythrocytes are capable of endocytosis. *In Vitro Cell Dev Biol*, 24, 481-6.
- Cai, Y., Yan, W., Xu, W., Yin, Y., He, Y., Wang, H. & Zhang, X. 2013. Screening and identification of DnaJ interaction proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Microbiol*, 67, 732-41.
- Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A. & Zachariae, W. 2003. The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Mol Cell*, 12, 87-100.
- Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 79-87.
- Cooke, B. M., Buckingham, D. W., Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Bannister, L. H., Marti, M., Mohandas, N. & Coppel, R. L. 2006. A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J Cell Biol*, 172, 899-908.
- Cooke, B. M., Lingelbach, K., Bannister, L. H. & Tilley, L. 2004. Protein trafficking in *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Trends Parasitol*, 20, 581-9.
- Coppel, R. L., Lustigman, S., Murray, L. & Anders, R. F. 1988. MESA is a *Plasmodium falciparum* phosphoprotein associated with the erythrocyte membrane skeleton. *Mol Biochem Parasitol*, 31, 223-31.

- Coulson, R. M., Hall, N. & Ouzounis, C. A. 2004. Comparative genomics of transcriptional control in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genome Res*, 14, 1548-54.
- Cowman, A. F. & Crabb, B. S. 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124, 755-66.
- Cox, F. E. 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*, 3, 5.
- Craig, A. & Scherf, A. 2001. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol*, 115, 129-43.
- Craney, A. & Rape, M. 2013. Dynamic regulation of ubiquitin-dependent cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, 25, 704-10.
- Cui, L., Mharakurwa, S., Ndiaye, D., Rathod, P. K. & Rosenthal, P. J. 2015. Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network. *Am J Trop Med Hyg*, 93, 57-68.
- Culvenor, J. G., Day, K. P. & Anders, R. F. 1991. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. *Infect Immun*, 59, 1183-7.
- Czesny, B., Goshu, S., Cook, J. L. & Williamson, K. C. 2009. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 4080-5.
- Chan, J. Y., Kwong, M., Lo, M., Emerson, R. & Kuypers, F. A. 2001. Reduced oxidative-stress response in red blood cells from p45NFE2-deficient mice. *Blood*, 97, 2151-8.
- Charpian, S. & Przyborski, J. M. 2008. Protein transport across the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*: into the great wide open. *Traffic*, 9, 157-65.
- Chastagner, P., Israel, A. & Brou, C. 2008. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PLoS One*, 3, e2735.
- Chavchich, M., Gerena, L., Peters, J., Chen, N., Cheng, Q. & Kyle, D. E. 2010. Role of pfmdr1 amplification and expression in induction of resistance to artemisinin derivatives in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 2455-64.
- Chen, D., Shan, J., Zhu, W. G., Qin, J. & Gu, W. 2010. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature*, 464, 624-7.
- Chen, P. & Hochstrasser, M. 1996. Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, 86, 961-72.
- Chen, Q., Schlichtherle, M. & Wahlgren, M. 2000. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*, 13, 439-50.
- Chen, Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*, 7, 758-65.
- Chen, Z. J. & Sun, L. J. 2009. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell*, 33, 275-86.
- Chima, R. I., Goodman, C. A. & Mills, A. 2003. The economic impact of malaria in Africa: a critical review of the evidence. *Health Policy*, 63, 17-36.
- Chitra, S., Nalini, G. & Rajasekhar, G. 2012. The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases. *Int J Rheum Dis*, 15, 249-60.
- Choe, K. N., Nicolae, C. M., Constantin, D., Imamura Kawasawa, Y., Delgado-Diaz, M. R., De, S., Freire, R., Smits, V. A. & Moldovan, G. L. 2016. HUWE1 interacts with PCNA to alleviate replication stress. *EMBO Rep*, 17, 874-86.
- Chung, D. W., Ponts, N., Prudhomme, J., Rodrigues, E. M. & Le Roch, K. G. 2012. Characterization of the ubiquitylating components of the human malaria parasite's protein degradation pathway. *PLoS One*, 7, e43477.

- Da Silva, E., Foley, M., Dluzewski, A. R., Murray, L. J., Anders, R. F. & Tilley, L. 1994. The Plasmodium falciparum protein RESA interacts with the erythrocyte cytoskeleton and modifies erythrocyte thermal stability. *Mol Biochem Parasitol*, 66, 59-69.
- Daily, J. P. 2006. Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *J Clin Pharmacol*, 46, 1487-97.
- Dang, L. C., Melandri, F. D. & Stein, R. L. 1998. Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes. *Biochemistry*, 37, 1868-79.
- Danielsen, J. M., Sylvestersen, K. B., Bekker-Jensen, S., Szklarczyk, D., Poulsen, J. W., Horn, H., Jensen, L. J., Maimland, N. & Nielsen, M. L. 2011. Mass spectrometric analysis of lysine ubiquitylation reveals promiscuity at site level. *Mol Cell Proteomics*, 10, M110 003590.
- Dantuma, N. P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M. & Masucci, M. G. 2000. Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol*, 18, 538-43.
- Das, A., Syin, C., Fujioka, H., Zheng, H., Goldman, N., Aikawa, M. & Kumar, N. 1997. Molecular characterization and ultrastructural localization of Plasmodium falciparum Hsp 60. *Mol Biochem Parasitol*, 88, 95-104.
- Dayal, S., Sparks, A., Jacob, J., Allende-Vega, N., Lane, D. P. & Saville, M. K. 2009. Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J Biol Chem*, 284, 5030-41.
- Dayalan Naidu, S., Kostov, R. V. & Dinkova-Kostova, A. T. 2015. Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 36, 6-14.
- De Jong, A., Merckx, R., Berlin, I., Rodenko, B., Wijdeven, R. H., El Atmioui, D., Yalcin, Z., Robson, C. N., Neefjes, J. J. & Ovaa, H. 2012. Ubiquitin-based probes prepared by total synthesis to profile the activity of deubiquitinating enzymes. *Chembiochem*, 13, 2251-8.
- Degorce, F., Card, A., Soh, S., Trinquet, E., Knapik, G. P. & Xie, B. 2009. HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics*, 3, 22-32.
- Deitsch, K. W. & Wellems, T. E. 1996. Membrane modifications in erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol*, 76, 1-10.
- Dekker, C., Stirling, P. C., McCormack, E. A., Filmore, H., Paul, A., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C., Leroux, M. R. & Willison, K. R. 2008. The interaction network of the chaperonin CCT. *EMBO J*, 27, 1827-39.
- Digaleh, H., Kiaei, M. & Khodagholi, F. 2013. Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy. *Cell Mol Life Sci*, 70, 4681-94.
- Divo, A. A., Geary, T. G., Davis, N. L. & Jensen, J. B. 1985. Nutritional requirements of Plasmodium falciparum in culture. I. Exogenously supplied dialyzable components necessary for continuous growth. *J Protozool*, 32, 59-64.
- Dogovski, C., Xie, S. C., Burgio, G., Bridgford, J., Mok, S., Mccaw, J. M., Chotivanich, K., Kenny, S., Gnädig, N., Straimer, J., Bozdech, Z., Fidock, D. A., Simpson, J. A., Dondorp, A. M., Foote, S., Klonis, N. & Tilley, L. 2015. Targeting the cell stress response of Plasmodium falciparum to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol*, 13, e1002132.
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennand, A., Gualdron-Lopez, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., Coppens, I., Jayabalasingham, B., Langsley, G., De Castro, S. L., Menna-Barreto, R., Mottram, J. C., Navarro, M., Rigden, D. J., Romano, P. S., Stoka, V., Turk, B. & Michels, P. A. 2011. Autophagy in protists. *Autophagy*, 7, 127-58.
- Dyer, M. & Day, K. P. 2003. Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from in vitro cultures of Plasmodium falciparum. *Am J Trop Med Hyg*, 68, 403-9.

- Eastman, R. T. & Fidock, D. A. 2009. Artemisinin-based combination therapies: a vital tool in efforts to eliminate malaria. *Nat Rev Microbiol*, 7, 864-74.
- Eddins, M. J., Varadan, R., Fushman, D., Pickart, C. M. & Wolberger, C. 2007. Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH. *J Mol Biol*, 367, 204-11.
- Eglen, R. M., Reisine, T., Roby, P., Rouleau, N., Illy, C., Bosse, R. & Bielefeld, M. 2008. The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. *Curr Chem Genomics*, 1, 2-10.
- Ekkebus, R., Flierman, D., Geurink, P. P. & Ova, H. 2014. Catching a DUB in the act: novel ubiquitin-based active site directed probes. *Curr Opin Chem Biol*, 23, 63-70.
- Elford, B. C., Cowan, G. M. & Ferguson, D. J. 1995. Parasite-regulated membrane transport processes and metabolic control in malaria-infected erythrocytes. *Biochem J*, 308 (Pt 2), 361-74.
- Elia, A. E., Wang, D. C., Willis, N. A., Boardman, A. P., Hajdu, I., Adeyemi, R. O., Lowry, E., Gygi, S. P., Scully, R. & Elledge, S. J. 2015. RFW3-Dependent Ubiquitination of RPA Regulates Repair at Stalled Replication Forks. *Mol Cell*, 60, 280-93.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. & Schreiber, S. L. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, 268, 726-31.
- Ferreira, A., Marguti, I., Bechmann, I., Jeney, V., Chora, A., Palha, N. R., Rebelo, S., Henri, A., Beuzard, Y. & Soares, M. P. 2011. Sick hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*, 145, 398-409.
- Ferrington, D. A., Sun, H., Murray, K. K., Costa, J., Williams, T. D., Bigelow, D. J. & Squier, T. C. 2001. Selective degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome. *J Biol Chem*, 276, 937-43.
- Field, S. J., Pinder, J. C., Clough, B., Dlugowski, A. R., Wilson, R. J. & Gratzer, W. B. 1993. Actin in the merozoite of the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Cell Motil Cytoskeleton*, 25, 43-8.
- Figueiredo-Pereira, M. E., Berg, K. A. & Wilk, S. 1994. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem*, 63, 1578-81.
- Fislova, T., Thomas, B., Graef, K. M. & Fodor, E. 2010. Association of the influenza virus RNA polymerase subunit PB2 with the host chaperonin CCT. *J Virol*, 84, 8691-9.
- Fitch, C. D. 2004. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci*, 74, 1957-72.
- Fleige, T., Limenitakis, J. & Soldati-Favre, D. 2010. Apicoplast: keep it or leave it. *Microbes Infect*, 12, 253-62.
- Flores, M. V., Berger-Eiszele, S. M. & Stewart, T. S. 1997. Long-term cultivation of Plasmodium falciparum in media with commercial non-serum supplements. *Parasitol Res*, 83, 734-6.
- Foley, M., Murray, L. J. & Anders, R. F. 1990. The ring-infected erythrocyte surface antigen protein of Plasmodium falciparum is phosphorylated upon association with the host cell membrane. *Mol Biochem Parasitol*, 38, 69-75.
- Franco, J., Blackie, M. A., Toth, D., Smith, P. J., Capuano, J., Fastnacht, K. & Berkes, C. 2013. A structural comparative approach to identifying novel antimalarial inhibitors. *Comput Biol Chem*, 45, 42-7.
- Frickel, E. M., Quesada, V., Muething, L., Gubbels, M. J., Spooner, E., Ploegh, H. & Artavanis-Tsakonas, K. 2007. Apicomplexan UCHL3 retains dual specificity for ubiquitin and Nedd8 throughout evolution. *Cell Microbiol*, 9, 1601-10.

- Frosch, T., Koncarevic, S., Zedler, L., Schmitt, M., Schenzel, K., Becker, K. & Popp, J. 2007. In situ localization and structural analysis of the malaria pigment hemozoin. *J Phys Chem B*, 111, 11047-56.
- Fujimuro, M., Sawada, H. & Yokosawa, H. 1994. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett*, 349, 173-80.
- Gamo, F. J. 2014. Antimalarial drug resistance: new treatments options for Plasmodium. *Drug Discov Today Technol*, 11, 81-88.
- Gamo, F. J., Sanz, L. M., Vidal, J., De Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J. L., Vanderwall, D. E., Green, D. V., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peishoff, C. E., Cardon, L. R. & Garcia-Bustos, J. F. 2010. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465, 305-10.
- Ganesan, K., Ponmee, N., Jiang, L., Fowble, J. W., White, J., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Wilairat, P. & Rathod, P. K. 2008. A genetically hard-wired metabolic transcriptome in Plasmodium falciparum fails to mount protective responses to lethal antifolates. *PLoS Pathog*, 4, e1000214.
- Gantt, S. M., Myung, J. M., Briones, M. R., Li, W. D., Corey, E. J., Omura, S., Nussenzweig, V. & Sinnis, P. 1998. Proteasome inhibitors block development of Plasmodium spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 2731-8.
- Garcia-Serna, R. & Mestres, J. 2010. Anticipating drug side effects by comparative pharmacology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6, 1253-63.
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., Mcfadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M. & Barrell, B. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, 419, 498-511.
- Garrido, C., Ottavi, P., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P., Chauffert, B. & Mehlen, P. 1997. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res*, 57, 2661-7.
- Gehde, N., Hinrichs, C., Montilla, I., Charpian, S., Lingelbach, K. & Przyborski, J. M. 2009. Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, 71, 613-28.
- Geurink, P. P., Van Tol, B. D., Van Dalen, D., Brundel, P. J., Mevissen, T. E., Pruneda, J. N., Elliott, P. R., Van Tilburg, G. B., Komander, D. & Ovaa, H. 2016. Development of Diubiquitin-Based FRET Probes To Quantify Ubiquitin Linkage Specificity of Deubiquitinating Enzymes. *Chembiochem*, 17, 816-20.
- Gil, J. P., Nogueira, F., Stromberg-Norklit, J., Lindberg, J., Carrolo, M., Casimiro, C., Lopes, D., Arez, A. P., Cravo, P. V. & Rosario, V. E. 2003. Detection of atovaquone and Malarone resistance conferring mutations in Plasmodium falciparum cytochrome b gene (cytb). *Mol Cell Probes*, 17, 85-9.
- Ginsburg, H. & Stein, W. D. 2004. The new permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of the infected erythrocyte: comparison of results using different experimental techniques. *J Membr Biol*, 197, 113-34.
- Glenister, F. K., Fernandez, K. M., Kats, L. M., Hanssen, E., Mohandas, N., Coppel, R. L. & Cooke, B. M. 2009. Functional alteration of red blood cells by a megadalton protein of Plasmodium falciparum. *Blood*, 113, 919-28.

- Glickman, M. H. & Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82, 373-428.
- Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D. & Boivin, P. 1984. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res*, 44, 4137-9.
- Good, M. F. 2005. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol*, 21, 29-34.
- Gormley, J. A., Howard, R. J. & Taraschi, T. F. 1992. Trafficking of malarial proteins to the host cell cytoplasm and erythrocyte surface membrane involves multiple pathways. *J Cell Biol*, 119, 1481-95.
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H. & Duffy, P. E. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 118, 1266-76.
- Groll, M. & Potts, B. C. 2011. Proteasome structure, function, and lessons learned from beta-lactone inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 11, 2850-78.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P. & Dikic, I. 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol*, 5, 461-6.
- Hain, A. U., Bartee, D., Sanders, N. G., Miller, A. S., Sullivan, D. J., Levitskaya, J., Meyers, C. F. & Bosch, J. 2014. Identification of an Atg8-Atg3 protein-protein interaction inhibitor from the medicines for Malaria Venture Malaria Box active in blood and liver stage *Plasmodium falciparum* parasites. *J Med Chem*, 57, 4521-31.
- Haldar, K. & Uyetake, L. 1992. The movement of fluorescent endocytic tracers in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*, 50, 161-77.
- Hall, J. R., Kow, E., Nevis, K. R., Lu, C. K., Luce, K. S., Zhong, Q. & Cook, J. G. 2007. Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage. *Mol Biol Cell*, 18, 3340-50.
- Hamilton, M. J., Lee, M. & Le Roch, K. G. 2014. The ubiquitin system: an essential component to unlocking the secrets of malaria parasite biology. *Mol Biosyst*, 10, 715-23.
- Hanpude, P., Bhattacharya, S., Dey, A. K. & Maiti, T. K. 2015. Deubiquitinating enzymes in cellular signaling and disease regulation. *IUBMB Life*, 67, 544-55.
- Hanssen, E., Hawthorne, P., Dixon, M. W., Trenholme, K. R., Mcmillan, P. J., Spielmann, T., Gardiner, D. L. & Tilley, L. 2008. Targeted mutagenesis of the ring-exported protein-1 of *Plasmodium falciparum* disrupts the architecture of Maurer's cleft organelles. *Mol Microbiol*, 69, 938-53.
- Harbut, M. B., Patel, B. A., Yeung, B. K., Mcnamara, C. W., Bright, A. T., Ballard, J., Supek, F., Golde, T. E., Winzeler, E. A., Diagana, T. T. & Greenbaum, D. C. 2012. Targeting the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 21486-91.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295, 1852-8.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D. & Buchner, J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 842-6.
- Hassiepen, U., Eidhoff, U., Meder, G., Bulber, J. F., Hein, A., Bodendorf, U., Lorthiois, E. & Martoglio, B. 2007. A sensitive fluorescence intensity assay for deubiquitinating proteases using ubiquitin-rhodamine110-glycine as substrate. *Anal Biochem*, 371, 201-7.
- Hatabu, T., Hagiwara, M., Taguchi, N., Kiyozawa, M., Suzuki, M., Kano, S. & Sato, K. 2006. *Plasmodium falciparum*: the fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on *P. falciparum*. *Exp Parasitol*, 112, 179-83.

- Hatakeyama, S. & Nakayama, K. I. 2003. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun*, 302, 635-45.
- Hausmann, K., Hülsmann N. And Radek R. 2003. Protistology. In: VERLAGSBUCHHANDLUNG, E. S. S. (ed.) (*Nägele u. Obermiller*). 3rd ed. Stuttgart.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. & Wolf, D. H. 1997. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, 272, 25200-9.
- Hemelaar, J., Borodovsky, A., Kessler, B. M., Reverter, D., Cook, J., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K. D., Gill, G., Lima, C. D., Ploegh, H. L. & Ova, H. 2004. Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol*, 24, 84-95.
- Henriques, G., Van Schalkwyk, D. A., Burrow, R., Warhurst, D. C., Thompson, E., Baker, D. A., Fidock, D. A., Hallett, R., Flueck, C. & Sutherland, C. J. 2015. The Mu subunit of Plasmodium falciparum clathrin-associated adaptor protein 2 modulates in vitro parasite response to artemisinin and quinine. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 2540-7.
- Herman, A. G., Hayano, M., Poyurovsky, M. V., Shimada, K., Skouta, R., Prives, C. & Stockwell, B. R. 2011. Discovery of Mdm2-MdmX E3 ligase inhibitors using a cell-based ubiquitination assay. *Cancer Discov*, 1, 312-25.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, 258, 8206-14.
- Hiller, N. L., Bhattacharjee, S., Van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. & Haldar, K. 2004. A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, 306, 1934-7.
- Hjerpe, R., Aillet, F., Lopitz-Otsoa, F., Lang, V., England, P. & Rodriguez, M. S. 2009. Efficient protection and isolation of ubiquitylated proteins using tandem ubiquitin-binding entities. *EMBO Rep*, 10, 1250-8.
- Hjerpe, R. & Rodriguez, M. S. 2008. Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins. *Biochem Soc Trans*, 36, 823-7.
- Hochstrasser, M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458, 422-9.
- Hong, J. H., Kaustov, L., Coyaud, E., Srikumar, T., Wan, J., Arrowsmith, C. & Raught, B. 2015. KCMF1 (potassium channel modulatory factor 1) Links RAD6 to UBR4 (ubiquitin N-recognin domain-containing E3 ligase 4) and lysosome-mediated degradation. *Mol Cell Proteomics*, 14, 674-85.
- Hopkins, J., Fowler, R., Krishna, S., Wilson, I., Mitchell, G. & Bannister, L. 1999. The plastid in Plasmodium falciparum asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist*, 150, 283-95.
- Horrocks, P. & Newbold, C. I. 2000. Intraerythrocytic polyubiquitin expression in Plasmodium falciparum is subjected to developmental and heat-shock control. *Mol Biochem Parasitol*, 105, 115-25.
- Huang, D. T., Hunt, H. W., Zhuang, M., Ohi, M. D., Holton, J. M. & Schulman, B. A. 2007. Basis for a ubiquitin-like protein thioester switch toggling E1-E2 affinity. *Nature*, 445, 394-8.
- Huang, Q., Tang, X., Wang, G., Fan, Y., Ray, L., Bergmann, A., Belenkaya, T. Y., Ling, X., Yan, D., Lin, Y., Ye, X., Shi, W., Zhou, X., Lu, F., Qu, J. & Lin, X. 2014. Ubr3 E3 ligase regulates apoptosis by controlling the activity of DIAP1 in Drosophila. *Cell Death Differ*, 21, 1961-70.
- Huber, E. M. & Groll, M. 2012. The 19S cap puzzle: a new jigsaw piece. *Structure*, 20, 387-8.
- Hunt, P., Afonso, A., Creasey, A., Culleton, R., Sidhu, A. B., Logan, J., Valderramos, S. G., Mcnae, I., Cheesman, S., Do Rosario, V., Carter, R., Fidock, D. A. & Cravo, P. 2007. Gene

- encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol*, 65, 27-40.
- Hyde, J. E. 2002. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect*, 4, 165-74.
- Inoue, Y., Aizaki, H., Hara, H., Matsuda, M., Ando, T., Shimoji, T., Murakami, K., Masaki, T., Shoji, I., Homma, S., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T. & Suzuki, T. 2011. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology*, 410, 38-47.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. & Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 236, 313-22.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'connor, T. & Yamamoto, M. 2003. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 8, 379-91.
- Iwai, K. & Tokunaga, F. 2009. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation. *EMBO Rep*, 10, 706-13.
- Jacobs, A. T. & Marnett, L. J. 2007. Heat shock factor 1 attenuates 4-Hydroxynonenal-mediated apoptosis: critical role for heat shock protein 70 induction and stabilization of Bcl-XL. *J Biol Chem*, 282, 33412-20.
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M. T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T. & Mercereau-Puijalon, O. 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, 366, 1960-3.
- Jeney, V., Ramos, S., Bergman, M. L., Bechmann, I., Tischer, J., Ferreira, A., Oliveira-Marques, V., Janse, C. J., Rebelo, S., Cardoso, S. & Soares, M. P. 2014. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep*, 8, 126-36.
- Jensen, J. B. 2002. In vitro culture of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med*, 72, 477-88.
- Jeon, H. B., Choi, E. S., Yoon, J. H., Hwang, J. H., Chang, J. W., Lee, E. K., Choi, H. W., Park, Z. Y. & Yoo, Y. J. 2007. A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 731-6.
- Kabanova, S., Kleinbongard, P., Volkmer, J., Andree, B., Kelm, M. & Jax, T. W. 2009. Gene expression analysis of human red blood cells. *Int J Med Sci*, 6, 156-9.
- Kabir, M. A., Uddin, W., Narayanan, A., Reddy, P. K., Jairajpuri, M. A., Sherman, F. & Ahmad, Z. 2011. Functional Subunits of Eukaryotic Chaperonin CCT/TRiC in Protein Folding. *J Amino Acids*, 2011, 843206.
- Kaiser, S. E., Riley, B. E., Shaler, T. A., Trevino, R. S., Becker, C. H., Schulman, H. & Kopito, R. R. 2011. Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods*, 8, 691-6.
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K. & Nakayama, K. I. 2004. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol*, 6, 1229-35.
- Kang, X., Song, C., Du, X., Zhang, C., Liu, Y., Liang, L., He, J., Lamb, K., Shen, W. H. & Yin, Y. 2015. PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation. *Sci Rep*, 5, 17873.
- Karl, S., Davis, T. M. & St Pierre, T. G. 2010. Parameterization of high magnetic field gradient fractionation columns for applications with *Plasmodium falciparum* infected human erythrocytes. *Malar J*, 9, 116.
- Kasembeli, M., Lau, W. C., Roh, S. H., Eckols, T. K., Frydman, J., Chiu, W. & Tweardy, D. J. 2014. Modulation of STAT3 folding and function by TRiC/CCT chaperonin. *PLoS Biol*, 12, e1001844.

- Kesic, M. J., Simmons, S. O., Bauer, R. & Jaspers, I. 2011. Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 51, 444-53.
- Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., Harper, J. W. & Gygi, S. P. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell*, 44, 325-40.
- Kirk, K. 2001. Membrane transport in the malaria-infected erythrocyte. *Physiol Rev*, 81, 495-537.
- Kirkpatrick, D. S., Denison, C. & Gygi, S. P. 2005a. Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol*, 7, 750-7.
- Kirkpatrick, D. S., Weldon, S. F., Tsaprailis, G., Liebler, D. C. & Gandolfi, A. J. 2005b. Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. *Proteomics*, 5, 2104-11.
- Kisselev, A. F., Callard, A. & Goldberg, A. L. 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem*, 281, 8582-90.
- Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol*, 8, 739-58.
- Kisselev, A. F. & Goldberg, A. L. 2005. Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol*, 398, 364-78.
- Kisselev, A. F., Van Der Linden, W. A. & Overkleeft, H. S. 2012. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol*, 19, 99-115.
- Klonis, N., Crespo-Ortiz, M. P., Bottova, I., Abu-Bakar, N., Kenny, S., Rosenthal, P. J. & Tilley, L. 2011. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11405-10.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, 37, 937-53.
- Kramer, H. B., Nicholson, B., Kessler, B. M. & Altun, M. 2012. Detection of ubiquitin-proteasome enzymatic activities in cells: application of activity-based probes to inhibitor development. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 2029-37.
- Kreidenweiss, A., Kremsner, P. G. & Mordmuller, B. 2008. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malar J*, 7, 187.
- Krugliak, M. & Ginsburg, H. 2006. The evolution of the new permeability pathways in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes--a kinetic analysis. *Exp Parasitol*, 114, 253-8.
- Krugliak, M., Zhang, J. & Ginsburg, H. 2002. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 119, 249-56.
- Kulathu, Y. & Komander, D. 2012. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 508-23.
- Kulzer, S., Rug, M., Brinkmann, K., Cannon, P., Cowman, A., Lingelbach, K., Blatch, G. L., Maier, A. G. & Przyborski, J. M. 2010. Parasite-encoded Hsp40 proteins define novel mobile structures in the cytosol of the *P. falciparum*-infected erythrocyte. *Cell Microbiol*, 12, 1398-420.
- Kumar, M. & Mitra, D. 2005. Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. *J Biol Chem*, 280, 40041-50.
- Kwak, M. K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J. L., Yamamoto, M. & Kensler, T. W. 2003. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 23, 8786-94.

- Kwiatkowski, D., Hill, A. V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K. R., Cerami, A., Brewster, D. R. & Greenwood, B. M. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet*, 336, 1201-4.
- Laine, A., Topisirovic, I., Zhai, D., Reed, J. C., Borden, K. L. & Ronai, Z. 2006. Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol*, 26, 8901-13.
- Lambros, C. & Vanderberg, J. P. 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. *J Parasitol*, 65, 418-20.
- Landre, V., Rotblat, B., Melino, S., Bernassola, F. & Melino, G. 2014. Screening for E3-ubiquitin ligase inhibitors: challenges and opportunities. *Oncotarget*, 5, 7988-8013.
- Lang-Unnasch, N. & Murphy, A. D. 1998. Metabolic changes of the malaria parasite during the transition from the human to the mosquito host. *Annu Rev Microbiol*, 52, 561-90.
- Lanzer, M., Wickert, H., Krohne, G., Vincensini, L. & Braun Breton, C. 2006. Maurer's clefts: a novel multi-functional organelle in the cytoplasm of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Int J Parasitol*, 36, 23-36.
- Layfield, R., Tooth, D., Landon, M., Dawson, S., Mayer, J. & Alban, A. 2001. Purification of poly-ubiquitinated proteins by S5a-affinity chromatography. *Proteomics*, 1, 773-7.
- Lazarus, M. D., Schneider, T. G. & Taraschi, T. F. 2008. A new model for hemoglobin ingestion and transport by the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Cell Sci*, 121, 1937-49.
- Le Roch, K. G., Johnson, J. R., Florens, L., Zhou, Y., Santrosyan, A., Grainger, M., Yan, S. F., Williamson, K. C., Holder, A. A., Carucci, D. J., Yates, J. R., 3rd & Winzeler, E. A. 2004. Global analysis of transcript and protein levels across the Plasmodium falciparum life cycle. *Genome Res*, 14, 2308-18.
- Le Roch, K. G., Zhou, Y., Blair, P. L., Grainger, M., Moch, J. K., Haynes, J. D., De La Vega, P., Holder, A. A., Batalov, S., Carucci, D. J. & Winzeler, E. A. 2003. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*, 301, 1503-8.
- Lea, W. A. & Simeonov, A. 2011. Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opin Drug Discov*, 6, 17-32.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T. & Genschik, P. 2006. F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 631-8.
- Lehmann, A. R. 2011. Ubiquitin-family modifications in the replication of DNA damage. *FEBS Lett*, 585, 2772-9.
- Leitner, A., Joachimiak, L. A., Bracher, A., Monkemeyer, L., Walzthoeni, T., Chen, B., Pechmann, S., Holmes, S., Cong, Y., Ma, B., Ludtke, S., Chiu, W., Hartl, F. U., Aebersold, R. & Frydman, J. 2012. The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Structure*, 20, 814-25.
- Li, H., Bogyo, M. & Da Fonseca, P. C. 2016a. The cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 20S proteasome and its use in the fight against malaria. *FEBS J*, 283, 4238-4243.
- Li, H., O'donoghue, A. J., Van Der Linden, W. A., Xie, S. C., Yoo, E., Foe, I. T., Tilley, L., Craik, C. S., Da Fonseca, P. C. & Bogyo, M. 2016b. Structure- and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors. *Nature*, 530, 233-6.
- Li, H., Ponder, E. L., Verdoes, M., Asbjornsdottir, K. H., Deu, E., Edgington, L. E., Lee, J. T., Kirk, C. J., Demo, S. D., Williamson, K. C. & Bogyo, M. 2012. Validation of the proteasome as a therapeutic target in Plasmodium using an epoxyketone inhibitor with parasite-specific toxicity. *Chem Biol*, 19, 1535-45.
- Li, H., Van Der Linden, W. A., Verdoes, M., Florea, B. I., Mcallister, F. E., Govindaswamy, K., Elias, J. E., Bhanot, P., Overkleeft, H. S. & Bogyo, M. 2014. Assessing subunit dependency of the Plasmodium proteasome using small molecule inhibitors and active site probes. *ACS Chem Biol*, 9, 1869-76.

- Li, J. & Zhou, B. 2010. Biological actions of artemisinin: insights from medicinal chemistry studies. *Molecules*, 15, 1378-97.
- Li, M. L., Defren, J. & Brewer, G. 2013. Hsp27 and F-box protein beta-TrCP promote degradation of mRNA decay factor AUF1. *Mol Cell Biol*, 33, 2315-26.
- Lindenthal, C., Weich, N., Chia, Y. S., Heussler, V. & Klinkert, M. Q. 2005. The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of Plasmodium parasites. *Parasitology*, 131, 37-44.
- Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S. & Brodsky, F. M. 1995. Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*, 83, 257-67.
- Liu, X., Yang, X., Li, Y., Zhao, S., Li, C., Ma, P. & Mao, B. 2016. Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA damage response. *FEBS Lett*.
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A. & Dulak, J. 2016. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 73, 3221-47.
- Lopitz-Otsoa, F., Rodriguez-Suarez, E., Aillet, F., Casado-Vela, J., Lang, V., Matthiesen, R., Elortza, F. & Rodriguez, M. S. 2012. Integrative analysis of the ubiquitin proteome isolated using Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs). *J Proteomics*, 75, 2998-3014.
- Lopitz-Otsoa, F., Rodriguez, M. S. & Aillet, F. 2010. Properties of natural and artificial proteins displaying multiple ubiquitin-binding domains. *Biochem Soc Trans*, 38, 40-5.
- Lowe, E. D., Hasan, N., Trempe, J. F., Fonso, L., Noble, M. E., Endicott, J. A., Johnson, L. N. & Brown, N. R. 2006. Structures of the Dsk2 UBL and UBA domains and their complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 62, 177-88.
- Ma, Q. 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-26.
- Maier, A. G., Cooke, B. M., Cowman, A. F. & Tilley, L. 2009. Malaria parasite proteins that remodel the host erythrocyte. *Nat Rev Microbiol*, 7, 341-54.
- Maier, A. G., Rug, M., O'Neill, M. T., Beeson, J. G., Marti, M., Reeder, J. & Cowman, A. F. 2007. Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte surface. *Blood*, 109, 1289-97.
- Mao, Y., Desai, S. D., Ting, C. Y., Hwang, J. & Liu, L. F. 2001. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem*, 276, 40652-8.
- Marblestone, J. G., Larocque, J. P., Mattern, M. R. & Leach, C. A. 2012. Analysis of ubiquitin E3 ligase activity using selective polyubiquitin binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 2094-7.
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G. & Labib, K. 2014. Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science*, 346, 1253596.
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. 2004. Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306, 1930-3.
- Mason, D. E., Ek, J., Peters, E. C. & Harris, J. L. 2004. Substrate profiling of deubiquitin hydrolases with a positional scanning library and mass spectrometry. *Biochemistry*, 43, 6535-44.
- Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T. & Nakayama, K. I. 2005. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*, 5, 4145-51.
- Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D. S., Hymowitz, S. G., Rape, M., Kelley, R. F. & Dixit, V. M. 2010. K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Mol Cell*, 39, 477-84.
- McGouran, J. F., Gaertner, S. R., Altun, M., Kramer, H. B. & Kessler, B. M. 2013. Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes. *Chem Biol*, 20, 1447-55.

- McGouran, J. F., Kramer, H. B., Mackeen, M. M., Di Gleria, K., Altun, M. & Kessler, B. M. 2012. Fluorescence-based active site probes for profiling deubiquitinating enzymes. *Org Biomol Chem*, 10, 3379-83.
- Meierhofer, D., Wang, X., Huang, L. & Kaiser, P. 2008. Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. *J Proteome Res*, 7, 4566-76.
- Meisenberg, C., Tait, P. S., Dianova, I., Wright, K., Edelmann, M. J., Ternette, N., Tasaki, T., Kessler, B. M., Parsons, J. L., Kwon, Y. T. & Dianov, G. L. 2012. Ubiquitin ligase UBR3 regulates cellular levels of the essential DNA repair protein APE1 and is required for genome stability. *Nucleic Acids Res*, 40, 701-11.
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X. Z. & Wellems, T. E. 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, 19, 156-67.
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K. & Doumbo, O. K. 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415, 673-9.
- Mills, J. P., Diez-Silva, M., Quinn, D. J., Dao, M., Lang, M. J., Tan, K. S., Lim, C. T., Milon, G., David, P. H., Mercereau-Puijalon, O., Bonnefoy, S. & Suresh, S. 2007. Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9213-7.
- Mohanty, J. G., Nagababu, E. & Rifkind, J. M. 2014. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Front Physiol*, 5, 84.
- Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A. & Kan, Y. W. 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9926-30.
- Mok, S., Ashley, E. A., Ferreira, P. E., Zhu, L., Lin, Z., Yeo, T., Chotivanich, K., Imwong, M., Pukrittayakamee, S., Dhorda, M., Nguon, C., Lim, P., Amaratunga, C., Suon, S., Hien, T. T., Htut, Y., Faiz, M. A., Onyamboko, M. A., Mayxay, M., Newton, P. N., Tripura, R., Woodrow, C. J., Miotto, O., Kwiatkowski, D. P., Nosten, F., Day, N. P., Preiser, P. R., White, N. J., Dondorp, A. M., Fairhurst, R. M. & Bozdech, Z. 2015. Drug resistance. Population transcriptomics of human malaria parasites reveals the mechanism of artemisinin resistance. *Science*, 347, 431-5.
- Molestina, R. E., Miller, R. D., Lentsch, A. B., Ramirez, J. A. & Summersgill, J. T. 2000. Requirement for NF-kappaB in transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 1 by *Chlamydia pneumoniae* in human endothelial cells. *Infect Immun*, 68, 4282-8.
- Moore, J. 1886. Earthquake sounds. *Science*, 8, 348.
- Moreno, S. P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S. & Gambus, A. 2014. Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science*, 346, 477-81.
- Morimoto, R. I. & Santoro, M. G. 1998. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol*, 16, 833-8.
- Morrison, J., Laurent-Rolle, M., Maestre, A. M., Rajsbaum, R., Pisanelli, G., Simon, V., Mulder, L. C., Fernandez-Sesma, A. & Garcia-Sastre, A. 2013. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog*, 9, e1003265.
- Mundwiler-Pachlatko, E. & Beck, H. P. 2013. Maurer's clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 19987-94.
- Murphy, S. C., Fernandez-Pol, S., Chung, P. H., Prasanna Murthy, S. N., Milne, S. B., Salomao, M., Brown, H. A., Lomasney, J. W., Mohandas, N. & Haldar, K. 2007. Cytoplasmic remodeling of erythrocyte raft lipids during infection by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood*, 110, 2132-9.
- Nagababu, E., Chrest, F. J. & Rifkind, J. M. 2003. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1620, 211-7.

- Nagababu, E., Mohanty, J. G., Friedman, J. S. & Rifkind, J. M. 2013. Role of peroxiredoxin-2 in protecting RBCs from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Free Radic Res*, 47, 164-71.
- Nairz, M., Schleicher, U., Schroll, A., Sonnweber, T., Theurl, I., Ludwiczek, S., Talasz, H., Brandacher, G., Moser, P. L., Muckenthaler, M. U., Fang, F. C., Bogdan, C. & Weiss, G. 2013. Nitric oxide-mediated regulation of ferroportin-1 controls macrophage iron homeostasis and immune function in Salmonella infection. *J Exp Med*, 210, 855-73.
- Nakatani, Y., Konishi, H., Vassilev, A., Kurooka, H., Ishiguro, K., Sawada, J., Ikura, T., Korsmeyer, S. J., Qin, J. & Herlitz, A. M. 2005. p600, a unique protein required for membrane morphogenesis and cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15093-8.
- Neto, Z., Machado, M., Lindeza, A., Do Rosario, V., Gazarini, M. L. & Lopes, D. 2013. Treatment of Plasmodium chabaudi Parasites with Curcumin in Combination with Antimalarial Drugs: Drug Interactions and Implications on the Ubiquitin/Proteasome System. *J Parasitol Res*, 2013, 429736.
- Newton, K., Matsumoto, M. L., Wertz, I. E., Kirkpatrick, D. S., Lill, J. R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S. S., Fellouse, F. A., Komuves, L., French, D. M., Ferrando, R. E., Lam, C., Compaan, D., Yu, C., Bosanac, I., Hymowitz, S. G., Kelley, R. F. & Dixit, V. M. 2008. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*, 134, 668-78.
- Nguitragool, W., Bokhari, A. A., Pillai, A. D., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L. & Desai, S. A. 2011. Malaria parasite clag3 genes determine channel-mediated nutrient uptake by infected red blood cells. *Cell*, 145, 665-77.
- Nicholson, B., Kumar, S., Agarwal, S., Eddins, M. J., Marblestone, J. G., Wu, J., Kodrasov, M. P., Larocque, J. P., Sterner, D. E. & Mattern, M. R. 2014. Discovery of Therapeutic Deubiquitylase Effector Molecules: Current Perspectives. *J Biomol Screen*, 19, 989-99.
- Nicholson, B., Leach, C. A., Goldenberg, S. J., Francis, D. M., Kodrasov, M. P., Tian, X., Shanks, J., Sterner, D. E., Bernal, A., Mattern, M. R., Wilkinson, K. D. & Butt, T. R. 2008. Characterization of ubiquitin and ubiquitin-like-protein isopeptidase activities. *Protein Sci*, 17, 1035-43.
- Nielsen, M. L., Vermeulen, M., Bonaldi, T., Cox, J., Moroder, L. & Mann, M. 2008. Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry. *Nat Methods*, 5, 459-60.
- Nyalwidhe, J. & Lingelbach, K. 2006. Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Proteomics*, 6, 1563-73.
- Oaks, S. C. 1991. *Malaria : obstacles and opportunities : a report of the Committee for the Study on Malaria Prevention and Control: Status Review and Alternative Strategies, Division of International Health, Institute of Medicine, Washington, D.C., National Academy Press.*
- Okumu, F. O. & Moore, S. J. 2011. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated nets for malaria control in Africa: a review of possible outcomes and an outline of suggestions for the future. *Malar J*, 10, 208.
- Olagnier, D., Lavergne, R. A., Meunier, E., Lefevre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., Benoit-Vical, F., Ryffel, B., Coste, A., Berry, A. & Pipy, B. 2011. Nrf2, a PPARgamma alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog*, 7, e1002254.
- Olagnier, D., Peri, S., Steel, C., Van Montfoort, N., Chiang, C., Beljanski, V., Slifker, M., He, Z., Nichols, C. N., Lin, R., Balachandran, S. & Hiscott, J. 2014. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog*, 10, e1004566.

- Ota, K., Kito, K., Iemura, S., Natsume, T. & Ito, T. 2008. A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins. *Proteomics*, 8, 3004-7.
- Ovaa, H., Kessler, B. M., Rolen, U., Galardy, P. J., Ploegh, H. L. & Masucci, M. G. 2004. Activity-based ubiquitin-specific protease (USP) profiling of virus-infected and malignant human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2253-8.
- Owen, D. J., Collins, B. M. & Evans, P. R. 2004. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 153-91.
- Page, A., Volchkova, V. A., Reid, S. P., Mateo, M., Bagnaud-Baule, A., Nemirov, K., Shurtleff, A. C., Lawrence, P., Reynard, O., Ottmann, M., Lotteau, V., Biswal, S. S., Thimmulappa, R. K., Bavari, S. & Volchkov, V. E. 2014. Marburgvirus hijacks nrf2-dependent pathway by targeting nrf2-negative regulator keap1. *Cell Rep*, 6, 1026-36.
- Paget-Mcnicol, S. & Saul, A. 2001. Mutation rates in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*, 122, 497-505.
- Parcellier, A., Schmitt, E., Gurbuxani, S., Seigneurin-Berny, D., Pance, A., Chantome, A., Plenchette, S., Khochbin, S., Solary, E. & Garrido, C. 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, 23, 5790-802.
- Parsons, J. L., Tait, P. S., Finch, D., Dianova, I., Edelmann, M. J., Khoronenkova, S. V., Kessler, B. M., Sharma, R. A., McKenna, W. G. & Dianov, G. L. 2009. Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair. *EMBO J*, 28, 3207-15.
- Parsons, K., Nakatani, Y. & Nguyen, M. D. 2015. p600/UBR4 in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 72, 1149-60.
- Pei, Y., Fu, W., Yang, E., Shen, A., Chen, Y. C., Gong, H., Chen, J., Huang, J., Xiao, G. & Liu, F. 2012. A Hsp40 chaperone protein interacts with and modulates the cellular distribution of the primase protein of human cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 8, e1002968.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. & Gygi, S. P. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, 21, 921-6.
- Percario, S., Moreira, D. R., Gomes, B. A., Ferreira, M. E., Goncalves, A. C., Laurindo, P. S., Vilhena, T. C., Dolabela, M. F. & Green, M. D. 2012. Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci*, 13, 16346-72.
- Petersen, I., Eastman, R. & Lanzer, M. 2011. Drug-resistant malaria: molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett*, 585, 1551-62.
- Philip, N. & Haystead, T. A. 2007. Characterization of a UBC13 kinase in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7845-50.
- Pieperhoff, M. S., Schmitt, M., Ferguson, D. J. & Meissner, M. 2013. The role of clathrin in post-Golgi trafficking in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One*, 8, e77620.
- Ponts, N., Saraf, A., Chung, D. W., Harris, A., Prudhomme, J., Washburn, M. P., Florens, L. & Le Roch, K. G. 2011. Unraveling the ubiquitome of the human malaria parasite. *J Biol Chem*, 286, 40320-30.
- Ponts, N., Yang, J., Chung, D. W., Prudhomme, J., Girke, T., Horrocks, P. & Le Roch, K. G. 2008. Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. *PLoS One*, 3, e2386.
- Prudencio, M., Rodriguez, A. & Mota, M. M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4, 849-56.
- Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P. & Le Roch, K. 2008. Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. *PLoS One*, 3, e2335.
- Przyborski, J. M., Wickert, H., Krohne, G. & Lanzer, M. 2003. Maurer's clefts--a novel secretory organelle? *Mol Biochem Parasitol*, 132, 17-26.

- Raasi, S., Varadan, R., Fushman, D. & Pickart, C. M. 2005. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 708-14.
- Radfar, A., Mendez, D., Moneriz, C., Linares, M., Marin-Garcia, P., Puyet, A., Diez, A. & Bautista, J. M. 2009. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *Nat Protoc*, 4, 1899-915.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., Goebel, M. G. & Iakoucheva, L. M. 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*, 78, 365-80.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., Akutsu, M., Suzuki, N., Kato, R., Kensche, T., Uejima, T., Bloor, S., Komander, D., Randow, F., Wakatsuki, S. & Dikic, I. 2009. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell*, 136, 1098-109.
- Ramasamy, M. S., Kulasekera, R., Wanniarachchi, I. C., Srikrishnaraj, K. A. & Ramasamy, R. 1997. Interactions of human malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*, with the midgut of *Anopheles* mosquitoes. *Med Vet Entomol*, 11, 290-6.
- Raventos-Suarez, C. 1985. *Plasmodium falciparum*: invasion and development in highly parasitized cultures. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21, 161-4.
- Reiter, K., Mukhopadhyay, D., Zhang, H., Boucher, L. E., Kumar, N., Bosch, J. & Matunis, M. J. 2013. Identification of biochemically distinct properties of the small ubiquitin-related modifier (SUMO) conjugation pathway in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 288, 27724-36.
- Review-Malaria, C. 2016. Available: <http://www.gponline.com/clinical-review-malaria/travel-health/travel-malaria/article/1101444>.
- Reynolds, J. M., El Bissati, K., Brandenburg, J., Gunzl, A. & Mamoun, C. B. 2007. Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin Pharmacol*, 7, 13.
- Rich, S. M., Leendertz, F. H., Xu, G., Lebreton, M., Djoko, C. F., Aminake, M. N., Takang, E. E., Diffo, J. L., Pike, B. L., Rosenthal, B. M., Formenty, P., Boesch, C., Ayala, F. J. & Wolfe, N. D. 2009. The origin of malignant malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14902-7.
- Rolland, T., Tasan, M., Charlotiaux, B., Pevzner, S. J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R., Kamburov, A., Ghiassian, S. D., Yang, X., Ghamsari, L., Balcha, D., Begg, B. E., Braun, P., Brehme, M., Broly, M. P., Carvunis, A. R., Convery-Zupan, D., Corominas, R., Coulombe-Huntington, J., Dann, E., Dreze, M., Dricot, A., Fan, C., Franzosa, E., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Hardy, M. F., Jin, M., Kang, S., Kiros, R., Lin, G. N., Luck, K., MacWilliams, A., Menche, J., Murray, R. R., Palagi, A., Poulin, M. M., Rambout, X., Rasla, J., Reichert, P., Romero, V., Ruyssinck, E., Sahalie, J. M., Scholz, A., Shah, A. A., Sharma, A., Shen, Y., Spirohn, K., Tam, S., Tejeda, A. O., Trigg, S. A., Twizere, J. C., Vega, K., Walsh, J., Cusick, M. E., Xia, Y., Barabasi, A. L., Iakoucheva, L. M., Aloy, P., De Las Rivas, J., Tavernier, J., Calderwood, M. A., Hill, D. E., Hao, T., Roth, F. P. & Vidal, M. 2014. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*, 159, 1212-26.
- Rug, M. & Maier, A. G. 2011. The heat shock protein 40 family of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *IUBMB Life*, 63, 1081-6.
- Rushmore, T. H., Morton, M. R. & Pickett, C. B. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem*, 266, 11632-9.
- Sachs, J. & Malaney, P. 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*, 415, 680-5.
- Sadanand, S. 2010. Malaria: an evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. *Yale J Biol Med*, 83, 185-91.
- Saliba, K. J. & Kirk, K. 1998. Clotrimazole inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92, 666-7.

- Sargeant, T. J., Marti, M., Caler, E., Carlton, J. M., Simpson, K., Speed, T. P. & Cowman, A. F. 2006. Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*, 7, R12.
- Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A. & Fukai, S. 2009. Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO J*, 28, 2461-8.
- Scaglione, K. M., Bansal, P. K., Deffenbaugh, A. E., Kiss, A., Moore, J. M., Korolev, S., Cocklin, R., Goebel, M., Kitagawa, K. & Skowrya, D. 2007. SCF E3-mediated autoubiquitination negatively regulates activity of Cdc34 E2 but plays a nonessential role in the catalytic cycle in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol*, 27, 5860-70.
- Scherf, A., Lopez-Rubio, J. J. & Riviere, L. 2008. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol*, 62, 445-70.
- Schlagenhauf, P. 2004. Malaria: from prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am*, 18, 189-205, table of contents.
- Schneider, S., Chen, H., Tang, J., Emkey, R. & Andrews, P. S. 2012. Development of a homogeneous AlphaLISA ubiquitination assay using ubiquitin binding matrices as universal components for the detection of ubiquitinated proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 2038-45.
- Schofield, L. & Grau, G. E. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*, 5, 722-35.
- Schwenk, R. J. & Richie, T. L. 2011. Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitol*, 27, 306-14.
- Seifert, U., Bialy, L. P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Kloetzel, P. M. & Kruger, E. 2010. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell*, 142, 613-24.
- Shi, D. & Grossman, S. R. 2010. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets. *Cancer Biol Ther*, 10, 737-47.
- Sigismund, S., Polo, S. & Di Fiore, P. P. 2004. Signaling through monoubiquitination. *Curr Top Microbiol Immunol*, 286, 149-85.
- Silva, M. D., Cooke, B. M., Guillotte, M., Buckingham, D. W., Sauzet, J. P., Le Scanf, C., Contamin, H., David, P., Mercereau-Puijalon, O. & Bonnefoy, S. 2005. A role for the *Plasmodium falciparum* RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol Microbiol*, 56, 990-1003.
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K. & Prudencio, M. 2008. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr Opin Microbiol*, 11, 352-9.
- Sistonen, L., Sarge, K. D. & Morimoto, R. I. 1994. Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol*, 14, 2087-99.
- Skaug, B., Jiang, X. & Chen, Z. J. 2009. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem*, 78, 769-96.
- Slater, L. H., Hett, E. C., Clatworthy, A. E., Mark, K. G. & Hung, D. T. 2013. CCT chaperonin complex is required for efficient delivery of anthrax toxin into the cytosol of host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9932-7.
- Sleigh, M. 1979. Biología de los Protozoos. Madrid: Blume.
- Smith, C. J., Berry, D. M. & Mcglade, C. J. 2013. The E3 ubiquitin ligases RNF126 and Rabring7 regulate endosomal sorting of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Sci*, 126, 1366-80.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. & Hay, S. I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434, 214-7.

- Soares, M. P. & Ribeiro, A. M. 2015. Nrf2 as a master regulator of tissue damage control and disease tolerance to infection. *Biochem Soc Trans*, 43, 663-8.
- Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D. R., Culhane, A. C., Moreau, L. A., Xia, B., Livingston, D. M. & Greenberg, R. A. 2007. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science*, 316, 1198-202.
- Sousa, R. & Lafer, E. M. 2015. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Front Mol Biosci*, 2, 26.
- Spadafora, C., Gerena, L. & Kopydlowski, K. M. 2011. Comparison of the in vitro invasive capabilities of *Plasmodium falciparum* schizonts isolated by Percoll gradient or using magnetic based separation. *Malar J*, 10, 96.
- Srivastava, I. K., Rottenberg, H. & Vaidya, A. B. 1997. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem*, 272, 3961-6.
- Stelter, P. & Ulrich, H. D. 2003. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, 425, 188-91.
- Stoll, F., Goller, A. H. & Hillisch, A. 2011. Utility of protein structures in overcoming ADMET-related issues of drug-like compounds. *Drug Discov Today*, 16, 530-8.
- Straimer, J., Gnadig, N. F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Duru, V., Ramadani, A. P., Dacheux, M., Khim, N., Zhang, L., Lam, S., Gregory, P. D., Urnov, F. D., Mercereau-Puijalon, O., Benoit-Vical, F., Fairhurst, R. M., Menard, D. & Fidock, D. A. 2015. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*, 347, 428-31.
- Sun, Y. 2005. Overview of approaches for screening for ubiquitin ligase inhibitors. *Methods Enzymol*, 399, 654-63.
- Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L. & Kaiser, P. 2006. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics*, 5, 737-48.
- Takada, K., Hirakawa, T., Yokosawa, H., Okawa, Y., Taguchi, H. & Ohkawa, K. 2001. Isolation of ubiquitin-E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) complexes from erythroleukaemia cells using immunoaffinity techniques. *Biochem J*, 356, 199-206.
- Targett, G. A. & Greenwood, B. M. 2008. Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria. *Malar J*, 7 Suppl 1, S10.
- Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E. H., Hayashi, H., Murata, S., Hiroaki, H., Sato, M., Tanaka, K. & Shirakawa, M. 2004. Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells*, 9, 865-75.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19, 94-102.
- Tilley, L., Sougrat, R., Lithgow, T. & Hanssen, E. 2008. The twists and turns of Maurer's cleft trafficking in *P. falciparum*-infected erythrocytes. *Traffic*, 9, 187-97.
- Todi, S. V., Winborn, B. J., Scaglione, K. M., Blount, J. R., Travis, S. M. & Paulson, H. L. 2009. Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *EMBO J*, 28, 372-82.
- Tomlins, A. M., Ben-Rached, F., Williams, R. A., Proto, W. R., Coppens, I., Ruch, U., Gilberger, T. W., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Muller, S. & Langsley, G. 2013. *Plasmodium falciparum* ATG8 implicated in both autophagy and apicoplast formation. *Autophagy*, 9, 1540-52.
- Tong, J., Taylor, P. & Moran, M. F. 2014. Proteomic analysis of the epidermal growth factor receptor (EGFR) interactome and post-translational modifications associated with receptor endocytosis in response to EGF and stress. *Mol Cell Proteomics*, 13, 1644-58.

- Trager, W. & Jensen, J. B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193, 673-5.
- Trelle, M. B., Salcedo-Amaya, A. M., Cohen, A. M., Stunnenberg, H. G. & Jensen, O. N. 2009. Global histone analysis by mass spectrometry reveals a high content of acetylated lysine residues in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Proteome Res*, 8, 3439-50.
- Trempe, J. F., Brown, N. R., Lowe, E. D., Gordon, C., Campbell, I. D., Noble, M. E. & Endicott, J. A. 2005. Mechanism of Lys48-linked polyubiquitin chain recognition by the Mud1 UBA domain. *EMBO J*, 24, 3178-89.
- Trinidad, A. G., Muller, P. A., Cuellar, J., Klejnot, M., Nobis, M., Valpuesta, J. M. & Vousden, K. H. 2013. Interaction of p53 with the CCT complex promotes protein folding and wild-type p53 activity. *Mol Cell*, 50, 805-17.
- Tsai, J. & Douglas, M. G. 1996. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem*, 271, 9347-54.
- Tschan, S., Brouwer, A. J., Werkhoven, P. R., Jonker, A. M., Wagner, L., Knittel, S., Aminake, M. N., Pradel, G., Joanny, F., Liskamp, R. M. & Mordmuller, B. 2013. Broad-spectrum antimalarial activity of peptido sulfonyl fluorides, a new class of proteasome inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 3576-84.
- Tsvetkov, L., Nanjundan, M., Domino, M. & Daniel, K. G. 2010. The ubiquitin-proteasome system and assays to determine responses to inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*, 5, 1221-36.
- Tung, C. W. & Ho, S. Y. 2008. Computational identification of ubiquitylation sites from protein sequences. *BMC Bioinformatics*, 9, 310.
- Vasilescu, J., Smith, J. C., Ethier, M. & Figeys, D. 2005. Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res*, 4, 2192-200.
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. & Liu, E. A. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303, 844-8.
- Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 944-57.
- Verdoes, M., Florea, B. I., Menendez-Benito, V., Maynard, C. J., Witte, M. D., Van Der Linden, W. A., Van Den Nieuwendijk, A. M., Hofmann, T., Berkers, C. R., Van Leeuwen, F. W., Groothuis, T. A., Leeuwenburgh, M. A., Ovaa, H., Neefjes, J. J., Filippov, D. V., Van Der Marel, G. A., Dantuma, N. P. & Overkleeft, H. S. 2006. A fluorescent broad-spectrum proteasome inhibitor for labeling proteasomes in vitro and in vivo. *Chem Biol*, 13, 1217-26.
- Vincensini, L., Fall, G., Berry, L., Blisnick, T. & Braun Breton, C. 2008. The RhopH complex is transferred to the host cell cytoplasm following red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 160, 81-9.
- Voth, D. E. & Heinzen, R. A. 2009. Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for *Coxiella burnetii* antiapoptotic activity. *Infect Immun*, 77, 205-13.
- Walker, D. M., Mahfooz, N., Kemme, K. A., Patel, V. C., Spangler, M. & Drew, M. E. 2013. *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage parasites require the putative autophagy protein PfAtg7 for normal growth. *PLoS One*, 8, e67047.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D. & Lithgow, T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep*, 5, 567-71.
- Walters, K. J., Lech, P. J., Goh, A. M., Wang, Q. & Howley, P. M. 2003. DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12694-9.

- Waller, R. F., Reed, M. B., Cowman, A. F. & Mcfadden, G. I. 2000. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J*, 19, 1794-802.
- Wang, L., Delahunty, C., Fritz-Wolf, K., Rahlfs, S., Helena Prieto, J., Yates, J. R. & Becker, K. 2015. Characterization of the 26S proteasome network in *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep*, 5, 17818.
- Wang, X., Lu, G., Li, L., Yi, J., Yan, K., Wang, Y., Zhu, B., Kuang, J., Lin, M., Zhang, S. & Shao, G. 2014. HUWE1 interacts with BRCA1 and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 444, 549-54.
- Wang, Z., Nie, Z., Chen, W., Zhou, Z., Kong, Q., Seth, A. K., Liu, R. & Chen, C. 2013. RNF115/BCA2 E3 ubiquitin ligase promotes breast cancer cell proliferation through targeting p21Waf1/Cip1 for ubiquitin-mediated degradation. *Neoplasia*, 15, 1028-35.
- Warrell, D. A. 2002. Clinical Features of Malaria. In: GILLES, D. A. W. A. H. M. (ed.) 4th ed.: London: Arnold Publishers.
- Waterkeyn, J. G., Wickham, M. E., Davern, K. M., Cooke, B. M., Coppel, R. L., Reeder, J. C., Culvenor, J. G., Waller, R. F. & Cowman, A. F. 2000. Targeted mutagenesis of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3) disrupts cytoadherence of malaria-infected red blood cells. *EMBO J*, 19, 2813-23.
- Weissman, A. M., Shabek, N. & Ciechanover, A. 2011. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 605-20.
- Wellems, T. E. & Plowe, C. V. 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*, 184, 770-6.
- White, E. A., Sowa, M. E., Tan, M. J., Jeudy, S., Hayes, S. D., Santha, S., Munger, K., Harper, J. W. & Howley, P. M. 2012. Systematic identification of interactions between host cell proteins and E7 oncoproteins from diverse human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E260-7.
- White, N., Nosten, F., Bjorkman, A., Marsh, K. & Snow, R. W. 2004. WHO, the Global Fund, and medical malpractice in malaria treatment. *Lancet*, 363, 1160.
- Who, W. M. R. 2015a. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed.
- Who, W. M. R. W. H. O. 2014. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/131953/1/9789240692695_spa.pdf?ua=1.
- Who, W. M. R. W. H. O. 2015b. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1&ua=1.
- Wickert, H., Gottler, W., Krohne, G. & Lanzer, M. 2004. Maurer's cleft organization in the cytoplasm of *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *Eur J Cell Biol*, 83, 567-82.
- Wickham, M. E., Rug, M., Ralph, S. A., Klonis, N., Mcfadden, G. I., Tilley, L. & Cowman, A. F. 2001. Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *EMBO J*, 20, 5636-49.
- Wilson, G. L. & Lill, M. A. 2011. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. *Future Med Chem*, 3, 735-50.
- Williams, R. L. & Urbe, S. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 355-68.
- Winzeler, E. A. & Manary, M. J. 2014. Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin. *Genome Biol*, 15, 544.
- Wiser, M. F., Lanners, H. N., Bafford, R. A. & Favaloro, J. M. 1997. A novel alternate secretory pathway for the export of *Plasmodium* proteins into the host erythrocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9108-13.
- Witola, W. H. & Ben Mamoun, C. 2007. Choline induces transcriptional repression and proteasomal degradation of the malarial phosphoethanolamine methyltransferase. *Eukaryot Cell*, 6, 1618-24.

- Xu, G. & Jaffrey, S. R. 2013. Proteomic identification of protein ubiquitination events. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 29, 73-109.
- Xu, G., Paige, J. S. & Jaffrey, S. R. 2010a. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol*, 28, 868-73.
- Xu, G. W., Ali, M., Wood, T. E., Wong, D., Maclean, N., Wang, X., Gronda, M., Skrtic, M., Li, X., Hurren, R., Mao, X., Venkatesan, M., Beheshti Zavareh, R., Ketela, T., Reed, J. C., Rose, D., Moffat, J., Batey, R. A., Dhe-Paganon, S. & Schimmer, A. D. 2010b. The ubiquitin-activating enzyme E1 as a therapeutic target for the treatment of leukemia and multiple myeloma. *Blood*, 115, 2251-9.
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D. & Peng, J. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 137, 133-45.
- Yam, A. Y., Xia, Y., Lin, H. T., Burlingame, A., Gerstein, M. & Frydman, J. 2008. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 1255-62.
- Yayon, A., Timberg, R., Friedman, S. & Ginsburg, H. 1984. Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *J Protozool*, 31, 367-72.
- Yokota, S., Kayano, T., Ohta, T., Kurimoto, M., Yanagi, H., Yura, T. & Kubota, H. 2000. Proteasome-dependent degradation of cytosolic chaperonin CCT. *Biochem Biophys Res Commun*, 279, 712-7.
- Zolg, J. W., Macleod, A. J., Scaife, J. G. & Beaudoin, R. L. 1984. The accumulation of lactic acid and its influence on the growth of *Plasmodium falciparum* in synchronized cultures. *In Vitro*, 20, 205-15.

8. Anexo

ANEXO I

The ubiquitin proteasome system (UPS) as a cancer drug target: emerging mechanisms and therapeutics

Lydia Mata-Cantero^{1,2}, Sofía Lobato-Gil², Fabienne Aillet²,
Valérie Lang², and Manuel S. Rodríguez².

Author details

¹Centro de Investigación Básica, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain

²Ubiquitylation and Cancer Molecular Biology, Inbiomed, Mikeletegi 81, 20009, San Sebastian, Spain.

Published in *Springer Science Books, Stress Response Pathways in Cancer: From Molecular Targets to Novel Therapeutics*. G.T. Wondrak (Ed.), 2014, pp. 223–263. DOI 10.1007/978-94-017-9421-3_11

ANEXO I

The ubiquitin proteasome system (UPS) as a cancer drug target: emerging mechanisms and therapeutics

ABSTRACT

The Ubiquitin-Proteasome System (UPS) plays an important role in the setting of the cellular response to multiple stress signals. Although the primary function of ubiquitin was initially associated with proteolysis, it is now considered as a key regulator of protein function controlling, among other functions, signalling cascades, transcription, apoptosis or oncogenesis. Failure at any level of the UPS is associated with the development of multiple pathologies including metabolic problems, immune diseases, inflammation and cancer. The successful use of the proteasome inhibitor Bortezomib (Velcade) in the treatment of multiple myeloma (MM) and mantle cell lymphoma (MCL) revealed the potential of the UPS as pharmacological target. Ten years later, new inhibitors tackling not only the proteasome but also different subsets of enzymes which conjugate or de-conjugate ubiquitin or ubiquitin-like molecules, have been developed. Most of them are excellent tools to characterize better the emerging molecular mechanisms regulating distinct critical cellular processes. Some of them have been launched already while many others are still in pre-clinical development. This chapter updates some of the most successful efforts to develop and characterize inhibitors of the UPS which tackle mechanisms involved in cancer. Particular attention has been dedicated to updating the status of the clinical trials of these inhibitors.

KEYWORDS

Proteasome, Chemical-inhibitors, Bortezomib, Clinical trials, Cancer, Ubiquitin, SUMO, NEDD8, Conjugating enzymes, Ligases, Isopeptidases, Deubiquitylating enzymes

1. INTRODUCTION

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major proteolytic system in the cytosol and nucleus of all eukaryotic cells (reviewed in Weissman et al. 2011). Most of our initial understanding of this pathway comes from biochemical approaches and genetic studies in yeast (reviewed in Weissman et al. 2011). Knowledge about the physiological roles of the UPS in mammalian cells was quite slow until cell-permeable proteasome inhibitors were developed (Palombella et al. 1994; Tsubuki et al. 1993). Proteasome inhibitors helped to demonstrate that 26S and 20S proteasomes contribute to the degradation of most short-lived and long-lived proteins that exhibit critical functions inside the cell such as transcription, apoptosis or cell cycle regulation, either through ubiquitin-dependent or ubiquitin-independent mechanisms (Glass and Gerner 1987; Tanaka et al. 1983). Consequently, UPS deregulation is linked to different human pathologies (Schwartz and Ciechanover 1999). In this chapter, we will focus on UPS inhibitors used in the treatment of cancer.

1.1. Ubiquitin Proteasome-System

The UPS is a complex system composed of multiple molecular machineries acting in a synchronous manner to maintain a dynamic equilibrium of their components. The UPS is often represented as two groups of separated molecular mechanisms: the first group comprises specific enzymes and cofactors acting to modify/demodify protein substrates with a single member of the ubiquitin family, the second group of the UPS is the 26S proteasome, of approximately 2,000 kDa, which is responsible for the proteolysis of labelled substrates.

1.2. Protein Modification by Ubiquitin and Ubiquitin Family Members

The ubiquitin family of protein modifiers, also known as Ubiquitin-like modifiers (Ubls), is composed of at least 15 members sharing a modest primary sequence identity with ubiquitin, but preserving its compact globular β -grasp fold (Hochstrasser 2009). In mammals, the family includes the small ubiquitin-like

modifier (SUMO), the neuronal precursor cell-expressed, developmentally down-regulated protein-8 (NEDD8, also known as Rub1 in yeast), the ubiquitin cross-reactive protein (UCRP, alternatively named interferon-stimulated gene-15 ISG15), the ubiquitin related modifier-1 (URM1), the human leukocyte antigen F-associated (FAT10), the Fau ubiquitin-like protein (FUB1), the MUB (membrane-anchored UBL), the ubiquitin fold-modifier-1 (UFM1), the ubiquitin-like protein-5 (UBL5, homologous to ubiquitin-1 [Hub1] in yeast), and the autophagy proteins ATG8 and ATG12.

Ubiquitin and all members of the ubiquitin family are attached to protein substrates through biochemical processes which are similar but implicate distinct sets of enzymes with the capacity to act on a limited number of reactions (Figure AI.1). All protein modifiers of the ubiquitin family are generated through the proteolytical cleavage of higher molecular weight precursors that exposes the double glycine (GG) signature, typically found in this family, and which is required for their attachment to protein substrates (reviewed in Jentsch and Pyrowolakis 2000). The attachment (or conjugation) of ubiquitin or UbL modifiers is mediated by a thiol-ester cascade of reactions that requires the action of three enzymes: an activating enzyme or E1 that will activate all molecules required for all reactions and a conjugating enzyme or E2 that, in most cases, will conjugate protein modifiers to their targets. Ubiquitin ligases or E3s are responsible for, or are required to achieve the conjugation of the modifier to its target protein (Figure AI.1). The role that an E3 will exert depends on its capacity to form thiol-ester intermediates with protein modifiers. The ubiquitin ligases of the HECT family are typical examples of these active enzymes. Another category of E3 ligases contributes to bring together substrates and E2s in order to achieve protein conjugation without having any enzymatic activity. Among this category of E3s, we found the cullin-RING ligase (CRLs) composed of multiple subunits that will allow the specific recognition of a degradable substrate (e.g. after its phosphorylation). The contribution of E4 factors favouring chain extension has also been proposed (Hoppe 2005). Chain formation is essential to drive distinct functions. While ubiquitin chain linkages K48 and K11 have been associated with degradation, K63 chains appear to connect signalling cascades, endocytic trafficking or DNA repair.

The formation of hybrid chains containing ubiquitin and UbLs such as SUMO2/3 is also possible (Aillet et al. 2012; Guzzo and Matunis 2013; Kulathu and Komander 2012) but a generic function of these chains has not been established. Deubiquitylating enzymes or DUBs recognize specific ubiquitin chains from target substrates through ubiquitin binding domains (UBDs) to know which chains should be cleaved (Eletr and Wilkinson 2014). An equivalent reaction is achieved by SUMO-specific proteases (SUSPs) or NEDD8 specific protease (NEDP1), also known as Denedylase 1 (DEN1) (Hickey et al. 2012). All isopeptidases show specificity for a modifier, however due to saturated in vitro assays, overexpression or certain stress conditions, cross-reactions have been reported thus making any conclusion on the exclusivity of these reactions difficult. Although the initial drug discovery strategies used enzymes recognizing protein substrates (E3s and isopeptidases) to develop new chemical inhibitors, nowadays all enzymes are considered as good candidates for drug development.

1.3. Proteasomes

The 26S proteasome is a multi-subunit complex formed by a barrel-shaped proteolytic core, the 20S core particle, and one or two regulatory 19S particles flanking the ends of the core to regulate the entry of proteins targeted for degradation (Figure AI.1) (Bedford et al. 2010). The 20S core particles consist of four stacked heptameric ring structures that are themselves composed of two different types of subunits. The two outer rings are formed by seven alpha subunits ($\alpha 1$ – $\alpha 7$) that allow the interaction with the 19S particle, while the inner rings are composed of seven beta subunits ($\beta 1$ – $\beta 7$), three of which are responsible for the catalytic activity. The catalytic mechanism of these subunits is the same because they use the hydroxyl group of the N-terminal threonine of a mature β -subunit to perform the nucleophilic attack on the carbonyl carbon of a peptide bond (Borissenko and Groll 2007; Kisselev and Goldberg 2001; Kisselev et al. 2012; Voges et al. 1999). Each subunit reacts with specific substrates: $\beta 1$ subunit possesses peptidyl-glutamyl peptide-hydrolyzing (PHGH) activity that cleaves after acid residues, $\beta 2$ has trypsin-like activity that cleaves after basic residues and $\beta 5$ subunit shows chymotrypsin-like activity that cleaves after hydrophobic residues.

Site-directed mutagenesis studies of these catalytic residues in yeast showed that the most drastic changes occurred when $\beta 5$ subunit is inactivated (Heinemeyer et al. 1997).

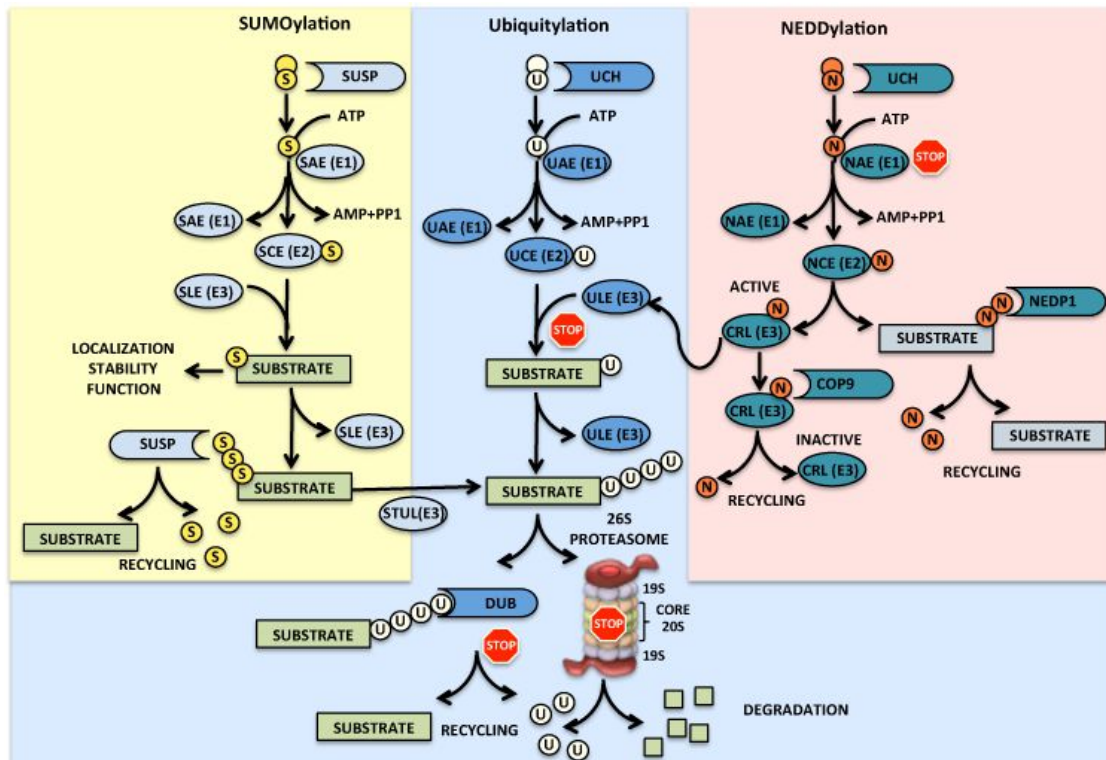


Figure AI. 1. Available drugs in clinical trials to block the Ubiquitin-Proteasome System. All members of the ubiquitin family are generated through a high molecular weight precursor that has to be cleaved by specific proteases to generate the mature form of each modifier. The covalent attachment of ubiquitin is mediated by a thiol-ester cascade of reactions involving at least three enzymes: an activating enzyme (AE) or E1, a conjugating enzyme (CE) or E2, and a ligase (LE) or E3. Ubiquitin-like proteins such as SUMO or NEDD8 have their own set of enzymes. Demodifying enzymes such as DUBs, SUSPs or NEDP1 participate in a proofreading mechanism. Multiple chain types can be formed and the composition of the chains is essential to drive distinct functions, including proteolysis by the 26S proteasome.

The 19S is divided into two sub-particles, the base and the lid. The lid contains at least nine non-ATPase polypeptide chains (RPN3, 5–9, 11, 12 and 15) that remove the polyubiquitin chains from the protein-substrates, while the base consists of four non-ATPase (RPN1, RPN2, and RPN13) and six ATPase subunits (RPT1–RPT6) that interact directly with α -rings. These ATPases control the

opening of the 20S gate that is normally locked until an unfolded substrate is recognized. Only the unfolding step involves ATP hydrolysis (Peth et al. 2010).

Apart from the proteasome, an immuno-proteasome exists in immune cells where the 11S subunit, also known as PA28 or REG, replaces the 19S subunit. The 11S is dominantly expressed in hematopoietic cells in response to pro-inflammatory signals such as interferon gamma or cytokines, and is involved in antigen processing for subsequent presentation to the MHC-I on the cell surface, allowing the initiation of the immune cell response (Rock et al. 1994; Tanaka and Kasahara 1998). Furthermore, the immuno-proteasome facilitates the clearance of protein aggregates to prevent cell death produced by IFN-induced oxidative stress, (Seifert et al. 2010). All proteasome inhibitors currently used in clinical trials block the enzymatic activities of the proteasome. However, the next generation of proteasome inhibitors will block other mechanism such as gate opening or regulatory subunits.

2. TARGETING PROTEASOMES

The first proteasome inhibitors made available were synthesized to specifically block the proteasome's active sites and to understand its enzymatic mechanism. Peptide aldehydes such as MG-132 were used to develop analogues with enhanced potency, selectivity and stability. Surprisingly, several studies showed that proteasome inhibitors induced rapid and selective apoptosis in different cancer derived cell lines, leading to the idea that proteasome inhibitors could be drug candidates. This idea was confirmed by the fact that the proteasome inhibitor Bortezomib regressed tumour size of xenograft tumours and also decreased metastasis and blocked angiogenesis in patients with hematologic malignancies. Thus, Bortezomib was the first proteasome inhibitor approved by the Food and drug Association of the United States (FDA). Since its approval in 2003, it became the frontline treatment for MM, it has been accepted as second line treatment of MCL and it has also been included in hundreds of on-going clinical trials. In addition to Bortezomib, Carfilzomib, another proteasome inhibitor, has

been approved for relapsed/refractory MM, and other proteasome inhibitors are in clinical and preclinical trials (Table AI.1).

2.1. Proteasome Inhibitors in Clinical Use

The new generation of proteasome inhibitors always aims to increase potency, specificity and stability with good bioavailability and pharmacokinetics. Conventional proteasome inhibitors efficiently block at least one of the three proteasome active sites ($\beta 1$, $\beta 2$ and $\beta 5$) either with covalent or non-covalent, reversible or irreversible binding. Most Inhibitors and drugs in clinical trials are mimetic peptides that interact directly with the active site thus blocking the nucleophilic attack of the hydroxyl group of the proteasome N-terminal threonine active sites (Kisselev and Goldberg 2001; Orłowski and Kuhn 2008). Proteasome inhibitors are often classified according to their functional group (Table AI.1).

Boronic acid peptides: Peptide aldehyde analogues were synthesized substituting the aldehyde group for boronic acid (Bortezomib) (Adams et al. 1998). Bortezomib is more potent, stable and interacts more specifically with the $\beta 5$ subunit, forming tetrahedral intermediates with two extra hydrogen bonds that stabilize the covalent bond (Groll et al. 2006). Bortezomib is a reversible inhibitor administered intravenously with very low dissociation rate that behaves as an irreversible molecule. It has a dose limiting toxicity and produces multiple side effects in patients, including pain, fatigue, gastrointestinal, cardiovascular and pulmonary disorders, neutropenia, thrombocytopenia and peripheral neuropathy. Despite its potency and effectiveness, about 60% of the treated patients develop resistance to Bortezomib after 1 year of treatment (Mujtaba et al. 2012). The resistance mechanisms are still poorly understood but have a multifactorial basis (Xolalpa et al. 2013). A second-generation of proteasome inhibitors, currently in clinical trials, includes the boronic acid peptides MLN2238, MLN9708 and CEP-18770. Unlike Bortezomib, these inhibitors reduce neuropathy. MLN2238 and its oral analogue MLN9708, are reversible inhibitors in phase III trials with stronger chymotrypsin like activity inhibition in vivo and a faster dissociation rate, able to penetrate inside tissues (Kupperman et al. 2010). The oral inhibitor CEP-18770 in

Table AI. 1. Proteasome inhibitors in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Disease	Reference
Bortezomib (Velcade)	Takeda	Proteasome $\beta 5 > \beta 1 > \beta 2$	Boronate	Reversible	IV SC IP	Launched	Cancer: Multiple myeloma, non-Hodgkin's lymphoma	(Adams et al, 1998) (McBride & Ryan, 2013) (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) www.clinicaltrials.gov
						Phase II	Cancer: B-cell lymphoma, hodking's lymphoma, leukaemia chronic lymphocytic, leukaemia acute myelogenous, small cell lung, non-small lung cell, prostate, gastrointestinal, breast, renal, liver, head and neck, ovarian, colorectal, oesophageal, pancreatic, sarcoma, bladder, glioblastoma, thyroid, osteosarcoma, mesothelioma, myelodysplastic syndrome, waldenstrom macroglobulinemia, unspecific solid tumor <i>Others:</i> Lupus, HCV, HIV, cytomegalovirus infections, thrombotic disorders	
						Phase I	Cancer: Melanoma, testicular, endometrial, metastatic, medulloblastoma	
Carfilzomib (PR171)	Onyx	Proteasome $\beta 5 >> \beta 1, \beta 2$	Epoxyketone	Irreversible	IV	Launched	Cancer: Multiple myeloma	(Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) (McBride & Ryan, 2013) (Demo et al, 2007) (Xolalpa et al, 2013) (Pautasso et al, 2013) www.clinicaltrials.gov
						Phase II	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, leukaemia chronic lymphocytic, small cell lung, non-small cell lung, renal, unspecified solid <i>Others:</i> Cytomegalovirus infections	
						Phase I	Cancer: Hodgkin's lymphoma, leukaemia acute lymphocytic, leukaemia acute myelogenous	
MLN9708 (Ixazomib)	Takeda	Proteasome $\beta 5 > \beta 1 > \beta 2$	Boronate	Reversible	IV Oral	Phase III	Cancer: Multiple myeloma	(Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) (McBride & Ryan, 2013) (Kupperman et al, 2010) (Xolalpa et al, 2013) www.clinicaltrials.gov
						Phase II	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, leukemia acute myelogenous	
						Phase I	Cancer: Hodgkin's lymphoma, leukemia acute lymphocytic, leukemia chronic lymphocytic, waldenstrom's hypergammaglobulinaemia, non-small cell lung, colorectal, melanoma, renal, sarcoma, prostate, pancreatic, head and neck, endometrial, breast, gastric, esophageal, testicular, liver, thyroid, unspecified solid	

Table AI.1. Proteasome inhibitors in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Disease	Reference
CEP-18770 (Delanzomib)	Teva	Proteasome $\beta 5 > \beta 1 > \beta 2$	Boronate	Reversible	IV Oral	Phase II	Cancer: Multiple myeloma	(Xolalpa et al, 2013) (Piva et al, 2008) (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) www.clinicaltrials.gov
						Phase I	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, non-small cell lung, colorectal, head and neck, ovarian, renal, prostate, unspecified solid	
ONX-0912 (Oprozomib)	Onix	Proteasome $\beta 5$	Epoxyketone	Irreversible	Oral	Phase II	Cancer: Multiple myeloma, non-hodgkin's lymphoma, hodgkin's lymphoma, leukemia chronic lymphocytic, leukemia chronic myelogenous, waldenstrom's hypergammaglobulinaemia	(Xolalpa et al, 2013) (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) (Chauhan et al, 2010) www.clinicaltrials.gov
						Phase I	Cancer: Non-small cell lung, liver, prostate melanoma, ovarian, renal, gastric, colonorectal, medulloblastoma, breast, sarcoma, unspecified solid	
NPI-0052 (Marizomib)	Nereus	Proteasome $\beta 5 > \beta 2 > \beta 1$	β -lactone	Irreversible	IV Oral	Phase I	Cancer: multiple myeloma, non-hodgkin's lymphoma, hodgkin's lymphoma, leukaemia chronic lymphocytic, leukaemia acute lymphocytic, leukaemia acute myelogenous, non-small cell lung, sarcoma, pancreatic, melanoma, prostate, liver, ovarian, breast, renal, gastric, unspecified solid	(Xolalpa et al, 2013) (Fenical et al, 2009) (McBride & Ryan, 2013) (Frankland-Searby & Bhaumik, 2012) www.clinicaltrials.gov
Syrbactins, Pono Pharma	Pono Pharma	Proteasome	Syrbactin	Irreversible	Unsp.	Preclinical	Cancer: Myeloma, unspecified	(Groll et al, 2008)
Proteasome inhibitor IkerChem	IkerChem	Proteasome	Unspecified	Unspecified	Unsp.	Preclinical	Cancer: haematological unspecified, solid unspecified	http://www.ikerchem.com/our_research.html
Peptide epoxyketones Onyx	Onyx	Proteasome	Epoxyketone	Unspecified	Unsp.	Preclinical	Immunological: Inflammatory disease unspecified	http://www.onyx-pharm.com/

Table AI.1. Proteasome inhibitors in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Disease	Reference
ONX-0914 (PR-957)	Onyx	Inmunoproteasome $\beta 5i/LMP7$	Epoxyketone	Irreversible	Unsp.	Preclinical	Immunological: Arthritis, rheumatoid, psoriasis, inflammatory bowel disease, lupus erythematosus Cancer: haematological, unspecified	(Verbrugge et al, 2012)
FV-162	Fluorinov Pharma	Proteasome $\beta 5$	Fluorine	Irreversible	Oral	Preclinical (Phase I planned)	Cancer: myeloma, non-Hodgkin's lymphoma	http://www.fluorinovpharma.com/
Bortezomib micelle	NanoCarrier	Proteasome $\beta 5 > \beta 1 > \beta 2$	Boronate	Reversible	Unspecified	Preclinical	Cancer: unspecified	http://www.nanocarrier.co.jp/en/research/pipeline/index.html
Timosaponin AIII (BN-108)	Bionovo	Proteasome	Steroidal saponin	Unspecified	Oral	Preclinical (Phase I/II planned)	Cancer: Breast	(Lok et al, 2011)

phase I and II trials shows encouraging results for the treatment of haematologic and solid tumours (Piva et al. 2008).

Epoxyketone peptides. These peptides are the most potent and specific proteasome inhibitors known. They form a morpholine adduct with the N-terminal threonine through a covalent and an irreversible bond (Groll et al. 2000). Carfilzomib (Demo et al. 2007) and ONX-0912 (Chauhan et al. 2010) belong to this class of inhibitors. They show a high chemical stability causing a stronger inhibition of the chymotrypsin-like proteasome activity than Bortezomib (Huber and Groll 2012), and overcome the problem of resistance to Bortezomib. Due to their higher specificity, neurotoxicity is reduced (Molineaux 2012) but other side effects still persist (Fostier et al. 2012). Carfilzomib is currently used for relapsed and refractory multiple myeloma and the orally bioavailable ONX-0912 is included in phase I and II trials where it has shown an improved therapeutic window.

β-lactones: Non-peptidic inhibitors have also been developed to improve bioavailability. The compound derived from the marine microorganism *Salinispora tropica*, Marizomib, is a β-lactone inhibitor in phase I trials (Fenical et al. 2009). Its β-lactone group reacts with the catalytic threonines of the proteasome active site forming an acyl-ester adduct and a tetrahydrofuran ring that stabilizes the binding leading to a highly potent, selective and orally bioactive proteasome inhibitor. Contrary to epoxyketones and peptide boronic acids, Marizomib inhibits the three activities of the proteasome irreversibly, in a stronger (more than 90%) and longer-lasting way (Miller et al. 2011). The use of Marizomib results in adverse effects such as fatigue, nausea, vomiting and dyspnea.

2.2. Development of new Proteasome Inhibitors

A second generation of proteasome inhibitors is being designed to specifically inhibit a subunit of interest, to reduce toxicity in normal cells and increase apoptosis in tumour cells (Parlati et al. 2009). This is the case of FV-162 that shows a better inhibition of chymotrypsin-like with an improved safety profile compared to Carfilzomib, and the epoxyketone ONX 0914. ONX 0914 is a potent drug orally

bioavailable for the immunoproteasome and has been developed for the treatment of autoimmune disorders.

Moreover, natural products and non-covalent proteasome inhibitors are also being developed to reduce side effects. Timosaponin AIII is an example of a natural product in preclinical development whose phases I/II in breast cancer are under preparation. Withaferin A and gambonic acid are other natural inhibitors, which have been approved by the Chinese FDA for cancer clinical trials.

To avoid resistance to proteasome inhibitors, and to limit the off-target effects, the development of compounds acting in a non-competitive way that do not directly interact with the active catalytic β subunit's site, has been considered. These compounds could potentially be used in combination with Bortezomib to improve clinical outcomes. For example, Rapamicin and PR-39 are compounds that bind to the $\alpha 7$ subunits, thereby producing a disruption in the interaction between 20S and 19S regulatory subunits that blocks the entry of the substrate (Gaczynska et al. 2003). 5-amino-8-hydroxyquinoline also interacts with the α -subunits inside the proteolytic chamber, while being cytotoxic for myeloma and leukemia cells in vitro, it has also been shown to decrease tumour size in xenograft tumour growth in vivo (Li et al. 2010), and overcomes resistance to Bortezomib in cultured cell lines.

2.3. Cellular Effects of Proteasome Inhibitors

Proteasome inhibitors are successful in cancer cells with high proliferative rates. Although all mechanisms are not fully understood, it seems that they block the degradation of proapoptotic proteins and cell cycle regulators (Figure A1.2). Among them, the tumor suppressors retinoblastoma (RB), p53 and the cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs), such as p21CIP1, p27KIP1 and p57KIP2 are degraded by the proteasome (Frankland-Searby and Bhaumik 2012; Rastogi and Mishra 2012; Vlachostergios et al. 2013). Regulators of the intrinsic apoptotic pathway are also controlled by the proteasome, including members of the BCL-2 protein family (p53-target-genes) such as the proapoptotic proteins BAX, BID, NOXA or BAD, and anti-apoptotic members such as BCL-XL and BCL-2. Bortezomib

treatment increases the expression of proapoptotic members such as BAX, SMAC and NOXA while anti-apoptotic proteins like BCL-2 and IAPs are down-regulated, thus favoring apoptosis in tumor cells (Crawford and Nahta 2011).

The mechanism to induce apoptosis of each proteasome inhibitor seems to be different, thus some combinations result in synergies. For example, Carfilzomib and Marizomib induce apoptosis mediated by caspase 8 and 9 better than Bortezomib, which is more dependent on Bax and Bak mitochondrion-mediated cell death (Kuhn et al. 2007; Miller et al. 2007).

The inhibition of NF κ B by Bortezomib seems to have an important role in this drug's mechanism of action, although it cannot explain all the anticancer effects (Figure A1.2). NF κ B-mediated transcription plays a crucial role in tumorigenesis by controlling among others the immune and inflammatory responses, apoptosis suppression (by inducing anti-apoptotic IAPs and BCL-XL proteins), angiogenesis promotion (by inducing vascular endothelial growth factor VEGF and COX2), favouring cell proliferation (by increasing cyclin D) and increasing cell migration (by inducing metallo-proteases) (Roccaro et al. 2006). Furthermore, constitutive expression of NF κ B has been related with resistance against radiation and chemotherapy in various types of cancer (Sunwoo et al. 2001).

Disruption of the proteasome activity also leads to the aggregation of unfolded proteins, thereby producing ER stress. An extensive protein production and secretion has been found in different types of cancer, becoming more sensitive to ER stress (Hoeller and Dikic 2009). ER stress leads to up-regulation of the endoribonuclease/kinase IRE1 α and the transcription factors ATF3&4 that will increase transcriptional activation of the pro-apoptotic Noxa (Armstrong et al. 2010). Autophagy is also induced by ER stress as a resistance mechanism to escape cell death through the eIF2 α induced pathway, the activation of HDAC6, the IRE1-JNK pathway, by proteasomal stabilization of ATF4, the inhibition of mTOR, and by the reduced proteasomal degradation of LC3 (Belloni et al. 2010). The activation of p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinases has been also reported after proteasome inhibition. This leads to 14-3-3 phosphorylation and consequently to cytochrome c release. The generation of reactive oxygen species (ROS) after the treatment with proteasome inhibitors results in the expression of apoptosis-related proteins

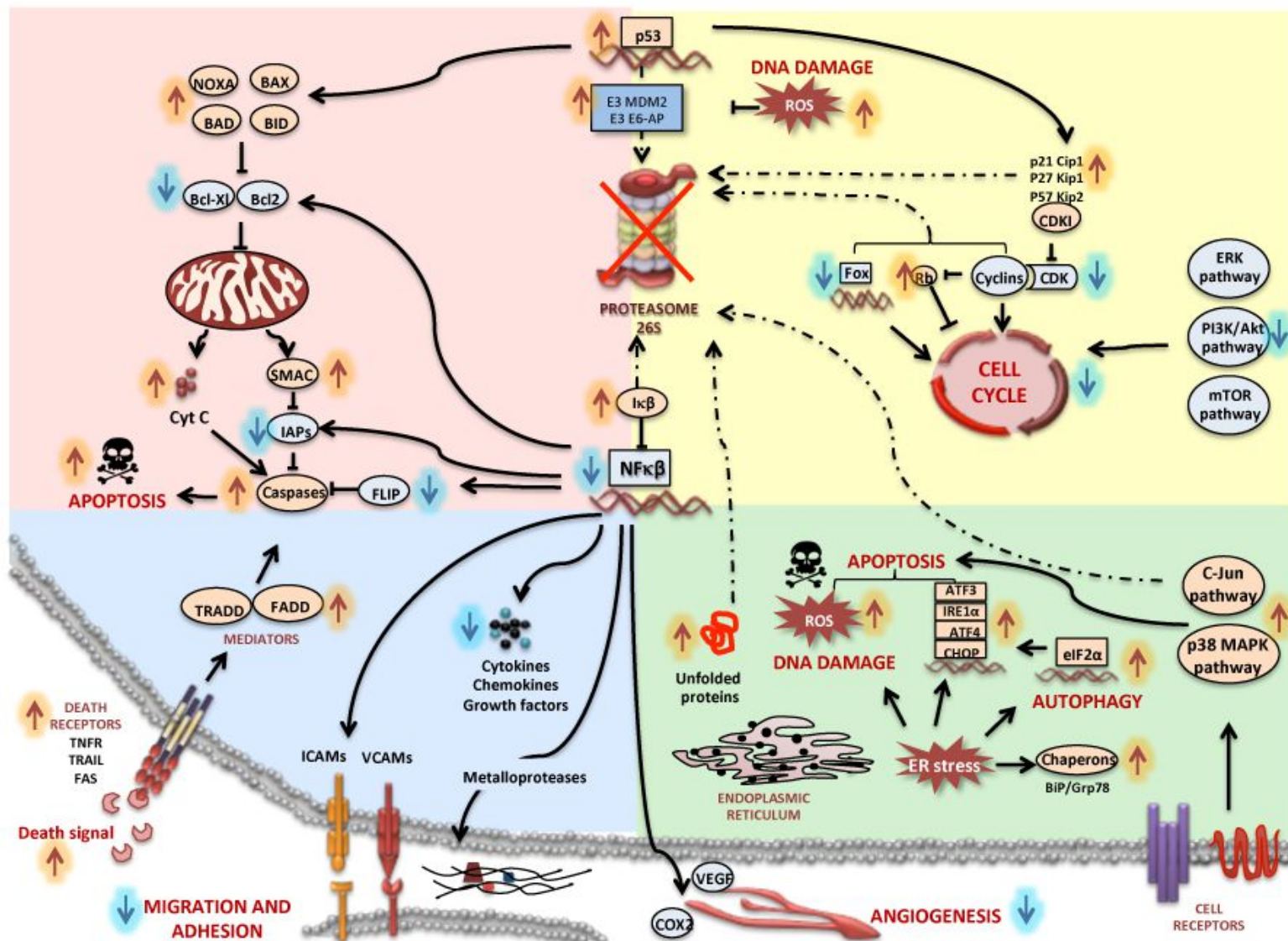


Figure AI. 1. Cellular effects of proteasome inhibition. Inhibition of the proteasome stabilizes and activates critical factors that control several apoptotic pathways in cancerous cells. Most pathways affected are involved in cell cycle control, cell proliferation, oncogenic activity, apoptosis, tumour suppressor functions and includes other multiple regulatory proteins (see main text)

(Fan et al. 2011). ROS are responsible for DNA damage and proteasome plays a crucial role in DNA repair through the activation of p53 and other pathways.

2.4. Experience with Clinical Trials

Bortezomib has shown promising activity and a durable response as a single agent in relapsed or refractory MCL and MM patients (Table AI.1). Trials in Phase I demonstrated an effective plateau at 65–70% proteasome inhibition with fair tolerance levels. In phase II, 35% of patients with refractory MM and 46.5% of patients with pre-treated MCL responded to Bortezomib, therefore the FDA initially approved it for relapsed/refractory MM in 2003, and subsequently for relapsed/refractory MCL in 2006 (Kane et al. 2006). Moreover, survival rates of refractory MM patients using Bortezomib in phase III trials exceeded the response rates for patients treated with the previous drug choice Dexamethasone, resulting in Bortezomib being approved as a first-line therapy in 2008 (Richardson et al. 2005). However the refractory response to Bortezomib depends on the tumour cell type. Pancreatic, prostate and non-small lung tumour cells are sensitive while diffuse large B cell lymphoma, follicular lymphoma, Waldenstrom's macroglobulinemia and some solid tumours such as sarcoma, renal cell carcinoma and glioma only provide slight and short responses (Frankland- Searby and Bhaumik 2012).

To overcome Bortezomib resistance, numerous combinations with chemotherapeutic agents, immunomodulators and/or other proteasome inhibitors are under investigation. In 2007, the FDA approved the use of a Bortezomib/Doxorubicin combination since it was better than the use of single compounds in phase III trials. Combinations with Doxorubicin/Adriamycin (ADR), Thalidomide, Melphalan, Dexamethasone, Cyclophosphamide and Myriad have also been successful. The most active combination to date includes Bortezomib, Lenalidomide and Dexamethasone, where overall responses of 100% were obtained in phase II. Early phase I and II clinical trials using combinations of Bortezomib with new immunomodulators, radio-immunotherapy, stem cell transplantation, monoclonal antibodies or chemotherapeutic agents have been promising. In addition, targeted therapies such as histone deacetylase inhibitors,

BCL-2 inhibitors, Rapamycin inhibitors, multiple kinase inhibitors (Akt, PKC, CDK inhibitors, etc.) and heat shock protein inhibitors simultaneously used with Bortezomib also show encouraging results (McBride and Ryan 2013).

MLN9708 shows synergistic effects in association with Bortezomib, Vorinostat, Lenalodome and Dexamethasone, in refractory MM (phase III) and first line MM patients (phase I/II) (McBride and Ryan 2013). Studies in phase I/II with Carfilzomib exhibit durable responses with acceptable toxicity in relapsed/refractory MM patients compared to Bortezomib and stem cell transplants, achieving a 24% partial response in heavily pre-treated patients (McBride and Ryan 2013; Pautasso et al. 2013). Several phase II trials are currently on-going for haematological malignancies and solid tumours. Phase I/II trials with different compound combinations including Calfizomib/Thalidomide/Dexamethasone/Cyclosporamide are being also tested as a frontline treatment for MM, showing promising activity with high response rates in the first patients evaluated.

The last proteasome inhibitor that entered into phase I clinical trials was Marizomib, used alone or in combination with Dexamethasone for the treatment of different kinds of cancer (see Table AI.1). In preclinical trials, Marizomib is also combined with Bortezomib, since different mechanisms of action have been suggested (McBride and Ryan 2013).

3. TARGETING NEDDYLATION

Together with ubiquitin and SUMO, NEDD8 is among the most studied ubiquitin- like proteins (Figure AI.1). The best known physiological substrates of NEDDylation are the cullins, which are structurally related proteins that function as molecular scaffolds of the cullin-RING family of E3 ubiquitin-ligases (CRLs). CRLs consist of a core cullin protein bound to a RING finger protein (RBX1/2) and an interchangeable substrate-binding adaptor protein (Bedford et al. 2011; Watson et al. 2011). RBX1 and RBX2 in conjunction with E2 enzymes UBC12 and UBE2F, respectively, promote NEDDylation of cullins (Huang et al. 2009). The

archetypal CRLs, the so-called SCF ubiquitin ligases, contain CUL1, RBX1/2 and the adaptor protein SKP1. This core complex binds to one of the approximately 100 F-box proteins that are responsible for recruiting substrates (Bedford et al. 2011). Cullin NEDDylation has been shown to increase the ubiquitylation activity of CRLs by promoting conformational changes that increase the binding of RBX1 to ubiquitin E2s, which results in a reduction of the distance between E2 and the substrate recognition component, it may also lead to displacement of the negative regulatory protein, CAND1, that binds to non-NEDDylated Cullin (Watson et al. 2011). Specifically, the CRLs have been established to control the degradation of proteins with important biological roles, including cell cycle progression (p27, cyclin E, c-Myc), tumour suppression (p53), DNA damage (CDT1), stress responses (NRF-2, HIF-1 α), and signal transduction (I κ B α). In addition, other NEDD8-regulated substrates with key cancer-related functions are β -catenin, c-JUN, mTOR and MDM2. Interestingly, increasing evidence suggests that NEDD8-mediated protein turnover may be deregulated in malignant cells and could result in oncogenic transformation, disease progression, or impart a drug-resistant phenotype (Nawrocki et al. 2012). For example, disruptions in the NEDD8 pathway lead breast cancer cells to acquire anti-estrogen resistance and expression of ER alpha (Fan et al. 2003). It has also been shown that increased NEDD8 conjugation appeared to be essential for the enhancement of proliferation in several types of human carcinoma cells (Chairatvit and Ngamkitidechakul 2007).

3.1. NEDDylation Inhibitors

Because many CRL substrates have tumour suppressor activity, preventing the degradation of these proteins could be an effective anticancer strategy that may also help to reduce toxicities resulting from global proteasomal inhibition (Nawrocki et al. 2012). MLN4924, a potent and selective first-in-class small molecule inhibitor developed by Millennium Pharmaceuticals, was reported as a specific inhibitor of protein NEDDylation through the inactivation of the heterodimer APPBP1 (NAE1) and UBA3 (UBE1C), also known as the NEDD8 activating enzyme NAE (Soucy et al. 2009; Wang et al. 2011). MLN4924 is an adenosine sulphonate that forms a covalent adduct with NEDD8 when bound to

Table AI. 2. Clinical trials for MLN4924

Disease type	Clinical status	With combination	MTD	Responses	Reference
Advanced Solid tumors	Phase I	Alone With dexamethasone (Dex)	50 mg/m ² in Schedule A (days 1-5)	Stable disease	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT00677170 Kauh et al., 2011. J Clin Oncol (ASCO Annual Meeting Abstracts) 29 (suppl; abstr 3013)
			67 mg/m ² in Schedule B (days 1, 3 and 5 + Dex)		
			50 mg/m ² in Schedule C (days 1, 3 and 5).		
Relapsed and/or refractory Hodgkin's Lymphoma, Non-Hodgkin's Lymphoma and Multiple Myeloma	Phase I	Alone	110 mg/m ² in Schedule A (days 1, 2, 8 and 9)	3 partial response and stable disease	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT00722488 (Nawrocki et al, 2012) Shah at al, 2010. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 116: abstract 2801. Harvey et al., 2012 (17 th Congress of European Hematology Association) abstract 1060 TrialTroveID-170665
			Not reported for Schedule B (days 1,4, 8 and 11) and Schedule C (days 1 and 8)		
			196 mg/m ² (twice-weekly schedule of days 1, 4, 8 and 11)		
Acute Myeloid Leukemia, Acute Lymphoblastic Leukemia, Myelodysplastic Syndromes	Phase I	Alone With azacitidine	59 mg/m ² (days 1, 3 and 5)	4 complete responses	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT00911066 Swords et al, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 116: abstract 658. (Nawrocki et al, 2012) (Zhao et al, 2014)
Metastatic Melanoma	Phase I	Alone	Has not been defined	1 partial response and 9 stable disease	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT01011530 Bhatia et al., 2011. J Clin Oncol (ASCO Annual Meeting Abstracts) 29 (suppl, abstr 8529)
Large B-cell Lymphoma	Phase I/II	Alone With standard EPOCH-R chemotherapy	Not reported	Not reported (study was withdrawn before participants were enrolled)	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT01415765 (Zhao et al, 2014)
Acute Myeloid Leukemia	Phase Ib	Alone With azacitidine	To be determined	Not reported	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT01814826 (Zhao et al, 2014)
Solid tumors	Phase Ib	With docetaxel With gemcitabine With carboplatin + paclitaxel	To be determined	Not reported	Clinicaltrials.gov Identifier: NCT01862328 (Zhao et al, 2014)

the NAE active site and in this way inhibits the formation of UBC12-NEDD8 thioester.

The MLN4924-NEDD8 adduct mimics the NEDD8-AMP in situ which is the first intermediate in the NAE reaction cycle, but cannot be enzymatically processed further (Brownell et al. 2010; Nawrocki et al. 2012). MLN4924 inhibits CRL activity and the stabilization of their substrates by blocking NAE, with subsequent implications in cancer cell growth and survival (Bedford et al. 2011).

In 2009, MLN4924 was first reported as a potent growth suppressor agent against a variety of cancer cells lines derived from solid tumours and haematological malignancies in both in vitro and in vivo xenograft models (Soucy et al. 2009; Zhao et al. 2014). During preclinical trials, tumour regression occurs after the action of different mechanisms depending on context and cell type. Induction of apoptosis is one of the reported effects mediated by MLN4924 in three different mechanisms mainly caused by the accumulation and stabilization of CRL substrates like: (1) CDT1, which trigger DNA re-replication and S phase arrest, (2) $I\kappa B\alpha$, that blocks NF κ B activation, and, (3) pro-apoptotic NOXA. In addition to apoptosis, MLN4924 also induces autophagy in a concentration- and time-dependent manner in multiple human cancer cell lines derived from carcinomas of breast, colon, liver, brain and cervix. Studies revealed that autophagy is mainly caused by inactivation of mTORC1, most likely mediated by accumulation of DEPTOR and HIF1 α , followed by the activation of the HIF1-REDD1-TSC1 axis. Some studies have also shown that MLN4924 can induce irreversible senescence in multiple cancer cell lines in a p21-dependent manner. In SK-BR3 cells, p16 and p27 accumulation may also contribute to the MLN4924-induced senescence. Furthermore, MLN4924 has a potential sensitizer role in chemotherapy and radiation, involving the mechanistic accumulation of c-Jun, NOXA, CDT1, WEE1 or p21, it also affects the promotion of c-FLIP degradation, increasing the expression of BCL-2-interacting killer (BIK), inactivating CRL3, as well as the suppression of FANCD2 monoubiquitylation and CHK1 phosphorylation, all of which results in a general increase in cellular sensitivity by enhancing DNA damage, oxidative stress, cell cycle arrest and finally apoptosis (Zhao et al. 2014). Despite this promising optimal strategy to inhibit NAE pathway, recently it has been identified that cancer

cells can develop resistance to MLN4924 treatment. Resistance has been linked to heterozygous mutations in two areas of NAE β (UBA3), the ATP binding pocket at Alanine 171 and at various residues within or close to the NEDD8-binding cleft. A point mutation in residue A171T reduced affinity for both MLN4924 and ATP. Interestingly, such resistance has been effectively bypassed by using a compound with tighter binding properties for NAE. These findings provide critical clinical aspects with respect to patient selection and consolidate efforts for the development of next-generation NAE inhibitors in order to overcome emergent mutations (Milhollen et al. 2012; Toth et al. 2012). In fact, by using a virtual screening approach, a natural product, 6,6''-biapigenin, has been identified and proposed as a second inhibitor of NAE (Leung et al. 2011). In 2012, a cyclometallated rhodium (III) complex was reported as the first metal complex to suppress the NEDDylation pathway via inhibition of NAE, which occupied the same binding pocket as MLN4924 (Zhong et al. 2012).

3.2. Experience with Clinical Trials

In parallel with the promising results in preclinical models, MLN4924 has been included in clinical trials for cancer therapy since 2008 (see Table A1.2). Up to now, there are a total of seven Phase I/II clinical trials for MLN4924 in patients with leukaemia, lymphoma, melanoma and several solid tumours. These trials were mainly designed to assess the safety, discomforts and risks of the inhibitor, to establish the maximum tolerated dose (MTD) that can be given to patients, to describe the pharmacokinetics (PK) parameters and pharmacodynamics (PD) effects, to evaluate disease response, and to study MLN4924 in combination with other standard treatments. In general, patients received escalating doses of MLN4924 that was administrated via intravenous infusion on different daily schedules. The pharmacokinetics of MLN4924 were measured in serial blood samples, bone marrow aspirates (BMAs), skin punch biopsies, or fine-needle tumour biopsies collected following drug dosing. The samples were analyzed to measure MLN4924-NEDD8 covalent adduct and the expression of CRL substrates, such as CDT1, NRF2, and phospho-I κ B α , as the biomarkers to indicate NAE inhibition in peripheral and tumour tissue (Zhao et al. 2014). The PK profiles were

similar following dosing on different days, suggesting no apparent accumulation of MLN4924 in plasma with an estimated half-life of 5–15 h. In general, most clinical trials carried out thus far have concluded that MLN4924 is well tolerated in the majority of the dosing schedules studied, with evidence of target inhibition and antitumoural activity which supports continued investigation of MLN4924, both alone and in combination strategies as potential treatment for a variety of human cancers (Nawrocki et al. 2012; Zhao et al. 2014).

4. TARGETING DUBS

The human genome encodes nearly 100 DUBs in five major classes: 60 Ubiquitin specific proteases (USPs), 16 Otubain-domain containing proteins (OTUs), 4 Machado-Joseph Domain (Josephin domain)-containing proteins (MJD), 4 ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs) and 8 Jab1/MPN domain-associated metalloisopeptidases (JAMM). USPs, OTUS, MJD and UCHs use an active site cysteine as a nucleophile to attack lysine-glycine isopeptide bonds within ubiquitylated proteins (Nijman et al. 2005), whereas the fifth class of DUBs contains a JAMM zinc metalloproteínase domain (Cope and Deshaies 2003). DUBs are generally expressed as active enzymes, rather than inactive precursors. However, certain DUBs require ubiquitin binding to obtain their active conformation and prevent their uncontrolled proteolytic activity. Structural data revealed that ubiquitin-binding by DUBs is accompanied by active site rearrangements, which are necessary to induce their hydrolytic activity (Edelmann et al. 2009; Komander et al. 2009). DUB activity is also regulated through the binding of scaffold and adaptor proteins (Ventii and Wilkinson 2008), proteolytic cleavages, as well as post-translational modifications (Kessler and Edelmann 2011).

4.1. DUBs as Therapeutic Targets

Due to the implication of DUBs in the regulation of crucial signalling pathways such as p53 and NFκB (Figure AI.2), it is not surprising that their deregulation is involved in a growing number of diseases, including neurological disorders, viral

infections and cancer. Indeed, some members of the DUBs family are known to contribute to neoplastic transformation, such as USP1 (in Fanconi anaemia), USP2 (in prostate cancer), DUB3 (in breast cancer), USP4 (in adenocarcinoma), USP7 (in prostate cancer and non-small-cell lung adenocarcinoma), USP9X (in both leukaemia and myelomas) and BRCC36 (in breast cancer) (Edelmann et al. 2011; Hussain et al. 2009). The genetic alteration of DUBs such as CYLD and USP6, has been associated with skin and bone marrow tumour progression, respectively. Finally, an alteration of expression of A20 (B-cell and T-cell lymphomas), USP10 (carcinomas) and BAP1 (brain, lung and testicular cancers) is observed in some cancers (Hussain et al. 2009; Nicholson et al. 2007; Sippl et al. 2011).

The high degree of substrate specificity and the well defined catalytic pocket make DUBs druggable and amenable to screening with libraries of small molecules (Eletr and Wilkinson 2014). Work carried out over the last few years has led to the identification of inhibitors with selective action against various USP targets, demonstrating the feasibility of selective targeting of DUBs. In general, the initial hits have been obtained by high throughput screening (HTS) of compound libraries, followed by further optimization using structure-activity relationships (Kramer et al. 2012). Companies like Novartis, Progenra and Hybrigenics have patented compounds inhibiting distinct DUBs (see Table A1.3). Some of them will be presented in the following section. However, to the best of our knowledge, only a few of them have, as yet, entered into clinical trials.

4.2. DUBs Inhibitors

Recently, a HTS approach led to the identification of two potent and selective reversible inhibitors of the enzymatic activity of the USP1/UAF1 complex, pimozone and GW7646. USP1, one of the best-characterized DUBs, is a regulator of several important steps in the DNA damage response, mainly in Fanconi anaemia (FA), an hereditary disorder characterized by congenital abnormalities, progressive bone marrow failure, hypersensitivity to DNA cross-linking agents, genomic instability and increased susceptibility to cancer (Li et al. 2002; Reyes-Turcu et al. 2009). USP1 is frequently overexpressed in tumours like cervical and gastric cancer, melanoma and sarcoma. Importantly, USP1 inhibitors act

synergistically with the chemotherapy drug cisplatin to inhibit the proliferation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells (Chen et al. 2011; Garcia-Santisteban et al. 2013).

One company, Hybrigenics, has developed a variety of different inhibitors of the USP family (Table AI.3). For example, HBX41-108 is a cyano-indenopyrazine derived small molecule compound which modulates the catalytic reaction of USP7 (Colland et al. 2009). USP7, also known as herpes virus-associated USP (HAUSP), is critical in cancer progression because of its destabilizing effect on the tumour suppressor p53 (Cheon and Baek 2006; Cummins and Vogelstein 2004). However, USP7 can also modify other substrates such as claspin, FOXO4 and PTEN, suggesting that USP7 exerts both p53-dependent and-independent effects on the control of cell proliferation and apoptosis (Faustrop et al. 2009; Song et al. 2008; van der Horst et al. 2006). HBX41-108 treatments stabilize p53, activate transcription of p53-target genes without inducing genotoxic stress, and inhibit cancer cell growth. Another compound more recently developed by Hybrigenics, HBX19-818, is a second-generation of irreversible USP7 inhibitors, it is more specific than HBX41-108, and is capable of regulating USP7 substrates in cancer cells and recapitulating the USP7 knockdown phenotype (Reverdy et al. 2012). Recently, an independent screen performed by Progenra also identified compound P005091, and analogues such as P045204 and P022077, as USP7 inhibitors capable of inducing apoptosis in multiple myeloma cells resistant to both conventional and Bortezomib therapies (Chauhan et al. 2012).

Another HTS identified IU1 as a selective and reversible small-molecule inhibitor of human USP14, which is, together with UCH37 and RPN11, a DUB associated with the proteasome. IU1 binds specifically to the activated form of USP14 and enhances the degradation of several proteins involved in neurodegenerative diseases (like Tau and ataxin-3), suggesting a potential strategy to reduce levels of misfolded and aggregated proteins in cells under proteotoxic stress (Lee et al. 2010; Todi and Paulson 2011).

Inhibitors of DUBs can also be used in antiviral drug development since viruses also encode for DUBs. For example, IU1, mentioned above, is also able to inhibit replication of Dengue virus (Nag and Finley 2012). In the case of Severe

Acute Respiratory Syndrome (SARS) caused by SARS-coronavirus, a DUB, called the papain-like protease (PLpro), blocks IRF3-dependent antiviral responses (Edelmann et al. 2011; Mielech et al. 2014). A non-covalent inhibitor of PLpro, GRL0617, has been synthesized. This inhibitor modifies the conformation of PLpro, inducing an inhibition of its catalytic activity, and selectively blocks SARS-Coronavirus viral replication without measurable cytotoxic effect (Ratia et al. 2008). Looking for effective therapeutics against severe acute SARS, 6-mercaptopurine (6MP) and 6-thioguanine (6TG) were found to be specific inhibitors for PLpro. The potential use of 6MP and 6TG as cellular DUB inhibitors has been further studied. The best docking score and binding energy for 6MP and 6TG is against USP14 (Chen et al. 2009; Chou et al. 2008).

4.3. Experience with Clinical Trials

Recently, Pimozide and GW7647 have been identified as potent inhibitors of USP1/ UAF1 (Chen et al. 2011). Pimozide is an antipsychotic drug also known for its neuroleptic property in the treatment of patients with schizophrenia (Opler and Feinberg 1991), Tourette syndrome and resistant tics. In addition, pimozide inhibits the proliferation of human melanoma and breast cancer cells (Neifeld et al. 1983; Strobl 1990) and is able to reverse the chemo resistance of non-small cell lung cancer cells to the DNA cross-linker, cisplatin, further supporting USP1/UAF1 as a potential target for novel anticancer therapy (Chen et al. 2011) (Table AI.3).

6MP6 and 6TG7 are antimetabolite antineoplastic agents with immunosuppressive properties, interfering with nucleic acid synthesis by inhibiting purine metabolism. These antimetabolites, also described as PLpro and potential USP14 inhibitors, are usually used in combination with other drugs, in the treatment of or in remission maintenance programs for leukaemia. Several clinical trials have been established or are currently in progress using 6MP6 (166 trials listed in www.clinicaltrial.gov) and 6TG7 (66 trials listed in www.clinicaltrial.gov), in combination with other chemotherapeutic drugs, for the treatment of leukaemia, brain tumour, breast and ovarian cancer, as well as immune diseases.

Table AI. 3. Inhibitors of Deubiquitylating enzymes in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Disease type	Reference
Pimozide	Janssen Pharmaceutica	USP1	diphenylbutylpiperidine	Reversible	Oral	Launched	Tourette syndrome, schizophrenia	(Chen et al, 2011) (Garcia-Santisteban et al, 2013, Zhang & Sidhu, 2014) (Opler & Feinberg, 1991) (Neifeld et al, 1983)
						Phase IV	Movement disorders	
						Phase II	Depression, bipolar disorders	
						Phase I	Anxiety	
						Preclinical	Breast cancer, melanoma, non-small-cell lung carcinoma	
6MG	GlaxoSmithKline	PLpro USP14	Thiopurine	Reversible	Oral	Launched	<i>Cancer:</i> Non-Hodgkin's lymphoma, acute lymphatic leukaemia <i>Other:</i> Psoriatic activity, inflammatory Bowel disease	(Chen et al, 2009) (Chou et al, 2008) (Sippl et al, 2011)
						Phase IV	<i>Cancer:</i> Leukemia acute lymphocytic <i>Other:</i> Crohn's disease ulcerative colitis, influenza vaccines, respiratory infections	
						Phase III	<i>Cancer:</i> Non-Hodgkin's lymphoma, <i>Other:</i> HBV, hepatitis vaccine	
						Phase II	<i>Cancer:</i> colorectal	
6TG7	GlaxoSmithKline	PLpro USP14	Thiopurine	Reversible	Oral	Launched	<i>Cancer:</i> Acute lymphoblastic leukaemia <i>Other:</i> Inflammatory Bowel disease	(Chen et al, 2009) (Chou et al, 2008) (Sippl et al, 2011)
						Phase IV	<i>Cancer:</i> Leukemia acute lymphocytic, leukemia acute myelogenous, non-Hodgkin's lymphoma <i>Other:</i> Crohn's disease, ulcerative colitis	
						Phase III	Myelodysplastic syndrome, supportive care	
						Phase II	<i>Cancer:</i> Breast, glioblastoma	
P-5091 P-022077	Progenra	USP7	tri-substituted thiophene	NS	Unspecified	Preclinical	Multiple Myeloma (MM) and other cancers	(Eaton et al, 2013)
GRL0617	Purdue University	PLpro	5-Amino-2-methyl-N-[(R)-1-(1-naphthyl)ethyl]benzamide	Irreversible	Unspecified	Preclinical	Viral infection	(Ratia et al, 2008)
HBX-19, 818 HBX-28, 258	Hybrigenics	USP7	Cyano-pyrazine derivatives	Irreversible	Unspecified	Discovery	Cancer	(Reverdy et al, 2012)
HBX-41, 108	Hybrigenics	USP7	Cyano-indenopyrazine	Reversible	Unspecified	Discovery	Cancer	(Reverdy et al, 2012) (Breidt et al, 2013)
IU1	Dan Finley's Laboratory	USP14	1-[1-(4-fluorophenyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl]-2-(1-pyrrolidinyl)-ethanone	Reversible	Unspecified	Discovery	Neurodegenerative diseases, Virus infection	(Lee et al, 2010) (Nag & Finley, 2012)
HBX 90,397	Hybrigenics	USP8	Cyano-pyrazine derivatives	NS	Unspecified	Discovery	Cancer	(Zhang & Sidhu, 2014)
GW7647	GlaxoSmithKline	USP1	Propanoic acid	Reversible	Unspecified	Discovery	Cancer	(Chen et al, 2011)

5. TARGETING UBIQUITIN LIGASES

Several specific E3 ubiquitin ligases have been reported as deregulated or overexpressed in various diseases and cancers. Here, we will describe inhibitors of specific E3 ligases already in preclinical development or in phase I clinical trials (see Table AI.4). However, due to the importance of the E3 ligase MDM2 in the regulation of the tumour suppressor p53, many small molecule inhibitors of this protein-protein interaction were initially developed.

5.1. Inhibitors of p53/MDM2

The tumour protein, p53, is involved in a broad range of critical pathways such as cell cycle, apoptosis, senescence, DNA repair, metabolism, development and innate immunity (Vousden and Prives 2009). p53 monitors the integrity of the genome and is tightly regulated by different intracellular pathways, its main regulator being the ubiquitin E3 Hdm2 ligase (MDM2 in mouse) that is involved in an auto-regulatory loop controlling p53 stability and activity. The transcription factor p53 has been found mutated and/or deregulated in about half of all known cancers (Soussi and Beroud 2001). In other cases, p53 remains functional but abnormally retained by overexpressed or mutated MDM2, or its homologue MDMX/MDM4.

In 1996, the high-resolution crystal structure of MDM2 with p53 was published (Kussie et al. 1996) and more recently, the MDMX/p53 crystal structure was resolved (Popowicz et al. 2008). From these studies, non-peptide small molecules inhibitors have been designed to specifically target the hydrophobic pocket including three trivial amino acids (Phe19, Trp23 and Leu26) common to both MDM2 and MDMX. Hoffmann-La Roche has been the first company to develop one of the most potent MDM2/p53 inhibitors, namely Nutlins. There are three generations of Nutlins (Nutlin-2, Nutlin-3a, RG-7112), with each generation aiming to improve the stability, affinity and bio-availability of the inhibitor. After optimization of Nutlin-3a, RG-7112 was the first MDM2 inhibitor used in clinical trials to treat multiple human cancers (Tovar et al. 2013). Other companies like

Amgen developed a series of optimized compounds from the piperidinone class of compounds, obtaining AM-8553 that efficiently inhibits tumour regression (Rew et al. 2012). Since 2013, Amgen also developed the MDM2 inhibitor, AMG-8735, containing a morpholinone core with a significant increase in both potency and metabolic stability compared to the piperidinone series. AMG-8735 emerges as an inhibitor with remarkable biochemical potency and pharmacokinetic properties (Gonzalez et al. 2014) (Table AI.4).

ATSP-7041, developed by Aileron Therapeutics, is the first highly potent and selective stapled α -helical peptide that functions as a dual inhibitor of MDM2 and MDMX. ATSP-7041 binds to MDM2 and MDMX with nanomolar affinities and restores p53 activity (Chang et al. 2013). ATSP-7041 has a potential use for the treatment of solid tumours and cancers like AML, CML, breast cancer, liposarcoma, melanoma or colon cancer. Stapled α -helical peptides emerged as a promising new modality for a wide range of therapeutic targets. Based on Nutlin-3a (Roche), MI-219 (Ascenta) and TDP 222669 (Johnson&Johnson) structures, and using an NMR spectroscopy approach as an *in silico* compound-selection process, Priaxon AG developed two new classes of MDM2-inhibitors, PXN-527 and PXN-523. These inhibitors have been tested in cellular cultures for inhibition of proliferation assays and are in preclinical trials (Cheek et al. 2011).

5.2. Inhibitors of Other E3 Ubiquitin Ligases

In addition to MDM2/MDMX inhibitors, other inhibitors of ubiquitin E3 ligases are also in clinical trials. Progenra developed PO13222, a compound capable of specifically inhibiting the E3 ubiquitin ligase, MuRF1, a ligase associated with muscle wasting diseases. PO13222 specifically inhibits auto-ubiquitylation activity, without affecting ubiquitin E1 and E2 enzymes, resulting in the stabilization of muscle protein. This product is in preclinical development since 2012, the aim of which is to provide a novel therapeutic strategy to protect muscles from sarcopenia (aging) and atrophy associated with common diseases (such as cancer, AIDS and congestive heart disease) and severe burns (Eddins et al. 2011) (Table AI.4).

Progenra has also developed Synoviolin / HRD1 inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). Synoviolin is a RING E3 ubiquitin ligase implicated in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway. Synoviolin is highly expressed in rheumatoid synovial cells and possibly involved in the pathogenesis of RA. Using HTS, two classes of small molecules have been identified that efficiently inhibit Synoviolin activity by inhibition of autoubiquitination enzymatic activity, thus blocking proliferation of synovial cells. This inhibitor has been in preclinical development since 2011 (Yagishita et al. 2012).

High-risk oncogenic human papillomavirus (HPV) types (including HPV 16 and HPV 18) are associated with 99.7% of all cervical cancers. The E6 and E7 oncoproteins are critical factors that maintain the malignant phenotype of HPV tumour cells. By using yeast two-hybrid screening, Cancer Therapeutics CRC developed linear short peptides that specifically bind with high affinity to the HPV16 E6 oncoprotein, affecting its interaction with the HECT-E3 ubiquitin ligase E6-AP (also known as UBE3A) that degrades p53. The restoration of intracellular p53 by using these short peptides is a new strategy for the treatment of HPV cancers. This E6AP inhibitor is in preclinical stage studies since 2012 (Dymalla et al. 2009).

The E3 ubiquitin ligase Cbl-b is a key regulator of activation thresholds in mature lymphocytes, and of immunological tolerance and autoimmunity. Apeiron Biologics developed the specific Cbl-b ligase inhibitor, APN-401, that stimulates immune cells, providing a novel way to treat cancer more effectively. This compound is under preclinical development since 2012 (www.clinicaltrials.gov).

The SIAH (Seven in Absentia Homologue) family of RING-E3 ubiquitin ligases regulates cellular events that are critical for cancer development and progression. Cancer Therapeutics developed a covalent peptides-based inhibitor (Cys-trapping moiety) to disrupt SIAH interactions with adaptor proteins, and thereby block cancer progression. These small molecule SIAH inhibitors are currently being tested in a preclinical phase for patients with breast, ovarian, prostate and pancreas cancers (Stebbins et al. 2013).

Table AI. 4. Inhibitors ubiquitin E3 ligases in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Cancer type	Reference
MK-8242	Merck & Co	p53-mdm2 interaction	Nutlins	Reversible	Oral	Phase I	Cancer: Leukaemia acute myelogenous, prostate, soft tissue sarcoma, unspecified solid	www.clinicaltrials.gov
SAR-405838	Ascenta Therapeutics	p53-Hdm2 interaction	Spirooxindole	Reversible	Oral	Phase I	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, soft tissue sarcoma, unspecified solid	(Shen et al, 2013)
RO-5503781	Hoffmann-La Roche	p53-Hdm2 interaction	Nutlins	Reversible	Oral	Phase I	Cancer: Leukaemia acute myelogenous, prostate, unspecified solid	(Wang et al, 2011)
DS-3032	Daiichi Sankyo	p53-mdm2 interaction	Imidazothiazole	Unspecified	Oral	Phase I	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, melanoma, unspecified solid	www.clinicaltrials.gov
CGM-097	Novartis	p53-Hdm2 interaction	Unspecified	Unspecified	Oral	Phase I	Cancer: Advanced solid tumours. Patients that do not respond to standard therapies	www.clinicaltrials.gov
TL-32711 (birinapant)	TetraLogic Pharmaceuticals	IAP	Propanamide	Unspecified	IV	Phase III	Cancer: colorectal Myelodysplastic syndrome	www.clinicaltrials.gov
						Phase II	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, leukaemia acute myelogenous, non small cell lung, small cell lung, melanoma, ovarian, pancreas, unspecified solid	
						Phase I	Cancer: Breast	
AT-406	Ascenta Therapeutics	XIAP, IAP1 and IAP2	carboxamide	Unspecified	Oral	Phase II	Cancer: head and neck	www.clinicaltrials.gov
						Phase I	Cancer: Non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, leukaemia acute myelogenous, non-small cell lung, breast, ovarian, unspecified solid	
LCL-161	Novartis	IAP	Unspecified	Unspecified	Oral	Phase II	Cancer: Multiple myeloma, breast	www.clinicaltrials.gov
						Phase I	Cancer: Pancreas, ovarian, colorectal, unspecified solid	
HGS-1029	Pharmascience	IAP2	Hydrochloride salt	Unspecified	IV	Phase I	Cancer: Non-hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, leukaemia acute lymphocytic, leukaemia chronic lymphocytic, non small cell lung, breast, colonorectal, head and neck, pancreas, prostate, unspecified solid	www.clinicaltrials.gov

Table AI.4. Inhibitors ubiquitin E3 ligases in clinical trials

Drug name	Company	Molecular target	Family structure	Binding type	Adms route	Clinical status	Cancer type	Reference
PO13222	Progenra	MuRF1	Unspecified	Reversible	Unspecified	Preclinical	Cancer Others: Prevention of muscle atrophy, AIDS, congestive heart disease, severe burns	(Eddins et al, 2011)
E6AP Inhibitor	Cancer Therapeutics CRC	E6AP	Unspecified	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer: HPV-related	(Dymalla et al, 2009)
AM-8735	Amgen	p53-Hdm2 interaction	Morpholinone	Unspecified	Oral	preclinical	Cancer unspecified	(Gonzalez et al, 2014)
ATSP-7041	Aileron Therapeutics Hoffmann-La Roche	Dual p53-Mdm2 p53-Mdmx	α -helical peptides	Unspecified	Unspecified	Preclinical (Phase I planned)	Cancer: Breast, colon Liposarcoma, melanoma, solid tumors Others: AML, CML	(Chang et al, 2013)
PXN-527 PXN-523	Priaxon Nexus Pharma	p53-Mdm2 interaction	Nutlins	Reversible	Oral	Preclinical	Cancer unspecified	(Cheok et al, 2011)
SIAH inhibitors	Cancer Therapeutics	SIAH protein interaction	Unspecified	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer: Pancreas, breast, ovarian, prostate	(Stebbins et al, 2013)
APN 401	Apeiron Biologics	Cbl-b	Nucleic acid: RNA interference	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer unspecified	(Bachmaier et al, 2000)
Synoviolin inhibitor	Progenra	Synoviolin	Unspecified	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Rheumatoid, Arthritis(RA)	(Yagishita et al, 2012)
T-3256336	Takeda	IAPs	Pyrazine scaffolds	Unspecified	Oral	Preclinical	Cancer unspecified	www.clinicaltrials.gov
IAP antagonist	Takeda	IAPs	Pyrazine scaffolds	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer unspecified	www.clinicaltrials.gov
IAP antagonist	Hoffmann-La Roche	IAPs	Benzoxazepinon	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer unspecified	www.clinicaltrials.gov
AZ7732	AstraZeneca	IAPs	Beta-alanine-derived	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer unspecified	www.clinicaltrials.gov
AT-IAP	Astex Pharmaceuticals	IAPs	Unspecified	Unspecified	Unspecified	Preclinical	Cancer unspecified	www.clinicaltrials.gov

5.3. Experience with Clinical Trials

The experience with ubiquitin E3 inhibitors in clinical trials is limited compared to proteasome inhibitors. Many of them are in phase I of clinical development and primary outcomes such as maximum tolerated dose, dose-limiting toxicities and safety are currently being evaluated. Subsequently, efficacy, pharmacokinetics and pharmacodynamics will be measured as secondary outcomes.

After the generation of the first inhibitor for MDM2, RG-7112, Hoffmann-la Roche developed another MDM2 inhibitor, RO-5503781, whose structure has not been published. This orally available inhibitor has been in phase I clinical trials since 2011 (NCT01462175), and is proposed to cancer patients with solid tumours and acute myelogenous advanced malignancies, except in the case of leukaemia. However, with respect to the latter, RO-5503781 has been included in another trial in combination with Cytarabine, a chemotherapeutic agent used for treatment of leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. A third trial is under consideration where RO5503781 will be used in association with Cytarabine and Anthracycline.

SAR-405838 is a small analogue molecule of MI-888 (small molecule inhibitors of MDM2), developed by Ascenta Therapeutics and Sanofi, that is currently in phase I of clinical trials since 2012, either alone (Clinical trial: NCT01985191) or in combination with Pimasertib (Clinical trial: NCT01636479). This oral drug may be used for patients with malignant neoplasm (Shen et al. 2013).

CGM097 is an oral HDM2/p53 inhibitor developed by Novartis for the treatment of cancer with advanced solid tumours, or for patients that have regressed despite standard therapy, or for whom no standard therapy exists. Cells have to exhibit wild type p53 to respond to this drug. CGM097 has been in phase I clinical trials since 2012 (NCT01760525).

Merck developed the MK-8242 inhibitor that is included in phase I clinical trials for patients with advanced solid tumours when there is no other treatment available, or for recurrent acute myelogenous leukaemia and liposarcomas. Like RO5503781, MK-8242 is also being evaluated in phase I clinical trials in combination with Cytarabine.

DS3032b is an oral MDM2 inhibitor that has been developed by Daichi Sankyo to treat patients with advanced solid tumours or lymphomas that exhibit mutated MDM2 and a WT p53. The description of this molecule has not yet been published but it has already been included in phase I clinical trials (NCT01877382).

6. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Even if the first pieces of the puzzle of this ATP-dependent pathway were discovered more than 30 years ago, every year new components and regulatory mechanisms controlling this system are being described. Despite this brief didactic view of the UPS classifying enzymes, cofactors and substrates, the system is a lot more complex than presented here, and there is still a distinct lack of knowledge with respect to its overall organization. For instance, it is well known that under certain circumstances several modifying/de-modifying enzymes can act on distinct members of the ubiquitin family (Leidecker et al. 2012), that proteasome subunits can be substrates of ubiquitin and ubiquitin-like molecules (Cui et al. 2014), or that the proteasome can also drive proteolysis in the absence of protein modification (Erales and Coffino 2014).

Although most of the functional outcomes of recent findings are not completely understood, it becomes clear that simply targeting a single enzyme substrate pair will be difficult. However, this should not stop the use of these inhibitors to treat distinct pathologies, as has recently occurred with proteasome inhibitors that block multiple processes, since the discovery of drugs acting at different levels will also increase the chances of clinical success. Furthermore, the experience using combinations of different inhibitors is quite positive in cases where patients do not respond or are resistant to the current treatments. Although these combinatorial drug therapies might appear to be in contradiction with the initial aim of reducing undesirable side effects, it is possible that eventually they could be more effective. A compromise between efficacy and cytotoxicity should be better defined by pharmacodynamics and pharmacokinetic studies.

Finally, although we described the use of UPS inhibitors to treat some cancers, many of them have also been used to treat quite diverse diseases such as cardiac,

immune and neurodegenerative disorders. The use of chemical inhibitors will contribute to a better understanding of the multiple cellular pathways regulated by the UPS. More importantly, these inhibitors will open up new perspectives for the treatment of various diseases, as has been the case for Bortezomib/Velcade (reviewed by Xolalpa et al. 2013).

REFERENCES

- Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL (1998) Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* 8:333–338
- Aillet F, Lopitz-Otsoa F, Egana I, Hjerpe R, Fraser P, Hay RT, Rodriguez MS, Lang V (2012) Heterologous SUMO-2/3-ubiquitin chains optimize I κ B α degradation and NF- κ B activity. *PLoS ONE* 7:e51672
- Armstrong JL, Flockhart R, Veal GJ, Lovat PE, Redfern CP (2010) Regulation of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by ATF4 in neuroectodermal tumor cells. *J Biol Chem* 285:6091–6100
- Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, Nishina H, Lipkowitz S, Penninger JM (2000) Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 403(6766):211–216
- Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J (2010) Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 20:391–401
- Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE (2011) Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10:29–46
- Belloni D, Veschini L, Foglieni C, Dell'Antonio G, Caligaris-Cappio F, Ferrarini M, Ferrero E (2010) Bortezomib induces autophagic death in proliferating human endothelial cells. *Exp Cell Res* 316:1010–1018
- Borissenko L, Groll M (2007) 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* 107:687–717
- Brownell JE, Sintchak MD, Gavin JM, Liao H, Bruzzese FJ, Bump NJ, Soucy TA, Milhollen MA, Yang X, Burkhardt AL et al (2010) Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like proteasome-inactivating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ. *Mol Cell* 37:102–111
- Chairatvit K, Ngamkitidechakul C (2007) Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem* 306:163–169
- Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To KH, Olson KA, Kesavan K, Gangurde P, Mukherjee A et al (2013) Stapled alpha-helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3445–E3454
- Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, Raje N, Richardson P, Anderson KC (2010) A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 116:4906–4915
- Chauhan D, Tian Z, Nicholson B, Kumar KG, Zhou B, Carrasco R, McDermott JL, Leach CA, Fulciniti M, Kodrasov MP, Weinstock J, Kingsbury WD, Hideshima T, Shah PK, Minvielle S, Altun M, Kessler BM, Orlowski R, Richardson P, Munshi N, Anderson KC (2012) A small molecule

- inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes Bortezomib resistance. *Cancer Cell* 22(3):345–358. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.007
- Chen X, Chou CY, Chang GG (2009) Thiopurine analogue inhibitors of severe acute respiratory syndrome-coronavirus papain-like protease, a deubiquitinating and deISGylating enzyme. *Antivir Chem Chemother* 19:151–156
- Chen J, Dexheimer TS, Ai Y, Liang Q, Villamil MA, Inglese J, Maloney DJ, Jadhav A, Simeonov A, Zhuang Z (2011) Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chem Biol* 18:1390–1400
- Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP (2011) Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 8:25–37 Cheon KW, Baek KH (2006) HAUSP as a therapeutic target for hematopoietic tumors (review). *Int J Oncol* 28:1209–1215
- Chou CY, Chien CH, Han YS, Prebanda MT, Hsieh HP, Turk B, Chang GG, Chen X (2008) Thiopurine analogues inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biochem Pharmacol* 75:1601–1609
- Chun-Nam L, Lai-King S, Fuli L, Chi-Ming C (2011) Activation of autophagy of aggregationprone ubiquitylated proteins by timosaponin A-III. *J Biol Chem* 286(36):31684–31696
- Colland F, Formstecher E, Jacq X, Reverdy C, Planquette C, Conrath S, Trouplin V, Bianchi J, Aushev VN, Camonis J et al (2009) Small-molecule inhibitor of USP7/HAUSP ubiquitin protease stabilizes and activates p53 in cells. *Mol Cancer Ther* 8:2286–2295
- Cope GA, Deshaies RJ (2003) COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* 114:663–671
- Crawford A, Nahta R (2011) Targeting Bcl-2 in herceptin-resistant breast cancer cell lines. *Curr Pharmacogenomics Personal Med* 9:184–190 Cui Z, Scruggs SB, Gilda JE, Ping P, Gomes AV (2014) Regulation of cardiac proteasomes by ubiquitination, SUMOylation, and beyond. *J Mol Cell Cardiol* 71:32–42. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.10.008, Epub 2013 Oct 17
- Cummins JM, Vogelstein B (2004) HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 3:689–692 Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, Jiang J, Laidig GJ, Lewis ER, Parlati F et al (2007) Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* 67:6383–6391
- Dymalla S, Scheffner M, Weber E, Sehr P, Lohrey C, Hoppe-Seyler F, Hoppe-Seyler K (2009) A novel peptide motif binding to and blocking the intracellular activity of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Mol Med (Berl)* 87:321–331
- Eddins MJ, Marblestone JG, Suresh Kumar KG, Leach CA, Sterner DE, Mattern MR, Nicholson B (2011) Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy. *Cell Biochem Biophys* 60:113–118
- Edelmann MJ, Iphofer A, Akutsu M, Altun M, di Gleria K, Kramer HB, Fiebigier E, Dhe-Paganon S, Kessler BM (2009) Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Biochem J* 418:379–390
- Edelmann MJ, Nicholson B, Kessler BM (2011) Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases. *Expert Rev Mol Med* 13:e35
- Eletr ZM, Wilkinson KD (2014) Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1843:114–128 Eroles J, Coffino P (2014) Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim Biophys Acta* 1843:216–221
- Fan M, Bigsby RM, Nephew KP (2003) The NEDD8 pathway is required for proteasome-mediated degradation of human estrogen receptor (ER)-alpha and essential for the antiproliferative activity of ICI 182,780 in ERalpha-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:356–365
- Fan WH, Hou Y, Meng FK, Wang XF, Luo YN, Ge PF (2011) Proteasome inhibitor MG-132 induces C6 glioma cell apoptosis via oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin* 32:619–625

- Fastrup H, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J, Mailand N (2009) USP7 counteracts SCFbetaTrCPbut not APCDdh1-mediated proteolysis of Claspin. *J Cell Biol* 184:13–19
- Fenical W, Jensen PR, Palladino MA, Lam KS, Lloyd GK, Potts BC (2009) Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem* 17:2175–2180
- Fostier K, De Becker A, Schots R (2012) Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and refractory multiple myeloma. *OncoTargets Ther* 5:237–244
- Frankland-Searby S, Bhaumik SR (2012) The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1825:64–76
- Gaczynska M, Osmulski PA, Gao Y, Post MJ, Simons M (2003) Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry* 42:8663–8670
- Garcia-Santisteban I, Peters GJ, Giovannetti E, Rodriguez JA (2013) USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy. *Mol Cancer* 12:91
- Glass JR, Gerner EW (1987) Spermidine mediates degradation of ornithine decarboxylase by a non-lysosomal, ubiquitin-independent mechanism. *J Cell Physiol* 130:133–141
- Gonzalez AZ, Eksterowicz J, Bartberger MD, Beck HP, Canon J, Chen A, Chow D, Duquette J, Fox BM, Fu J et al (2014) Selective and potent morpholinone inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction. *J Med Chem* 57:2472–2488
- Groll M, Bajorek M, Kohler A, Moroder L, Rubin DM, Huber R, Glickman MH, Finley D (2000) A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7:1062–1067
- Groll M, Huber R, Potts BC (2006) Crystal structures of Salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of betalactone ring opening and a mechanism for irreversible binding. *J Am Chem Soc* 128:5136–5141
- Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler RA (2008) Plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* 452(7188):755–758
- Guzzo CM, Matunis MJ (2013) Expanding SUMO and ubiquitin-mediated signaling through hybrid SUMO-ubiquitin chains and their receptors. *Cell Cycle* 12:1015–1017
- Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272:25200–25209
- Hickey CM, Wilson NR, Hochstrasser M (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:755–766
- Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458:422–429 Hoeller D, Dikic I (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature* 458:438–444
- Hoppe T (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: ‘one size’ doesn’t fit all. *Trends Biochem Sci* 30:183–187
- Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, Borg LA, Neale G, Murray PJ, Roussel MF et al (2009) E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 33:483–495
- Huber EM, Groll M (2012) Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:8708–8720
- Hussain S, Zhang Y, Galardy PJ (2009) DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors. *Cell Cycle* 8:1688–1697
- Jentsch S, Pyrowolakis G (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10:335–342

- Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R (2006) United States Food and Drug Administration approval summary: Bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 12:2955–2960
- Kessler BM, Edelmann MJ (2011) PTMs in conversation: activity and function of deubiquitinating enzymes regulated via post-translational modifications. *Cell Biochem Biophys* 60:21–38
- Kisselev AF, Goldberg AL (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8:739–758
- Kisselev AF, van der Linden WA, Overkleeft HS (2012) Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* 19:99–115
- Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JD, Odenwaelder P, Wilkinson KD, Barford D (2009) Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 10:466–473
- Kramer HB, Nicholson B, Kessler BM, Altun M (2012) Detection of ubiquitin-proteasome enzymatic activities in cells: application of activity-based probes to inhibitor development. *Biochim Biophys Acta* 1823:2029–2037
- Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, van Leeuwen FW, Chanan-Khan AA et al (2007) Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 110:3281–3290
- Kulathu Y, Komander D (2012) Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:508–523
- Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, Yu J, Yang Y, Hales P, Bruzzese F et al (2010) Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res* 70:1970–1980
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274:948–953
- Lee BH, Lee MJ, Park S, Oh DC, Elsasser S, Chen PC, Gartner C, Dimova N, Hanna J, Gygi SP et al (2010) Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* 467:179–184
- Leidecker O, Matic I, Mahata B, Pion E, Xirodimas DP (2012) The ubiquitin E1 enzyme Ube1 mediates NEDD8 activation under diverse stress conditions. *Cell Cycle* 11:1142–1150
- Leung CH, Chan DS, Yang H, Abagyan R, Lee SM, Zhu GY, Fong WF, Ma DL (2011) A natural product-like inhibitor of NEDD8-activating enzyme. *Chem Commun (Camb)* 47:2511–2513
- Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416:648–653
- Li X, Wood TE, Sprangers R, Jansen G, Franke NE, Mao X, Wang X, Zhang Y, Verbrugge SE, Adomat H et al (2010) Effect of noncompetitive proteasome inhibition on Bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst* 102:1069–1082
- McBride A, Ryan PY (2013) Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 13:339–358
- Mielech AM, Chen Y, Mesecar AD, Baker SC (2014) Nidovirus papain-like proteases: multifunctional enzymes with protease, deubiquitinating and deISGylating activities. *Virus Res.* pii:S0168-1702(14)00040-9. doi:10.1016/j.virusres.2014.01.025. [Epub ahead of print]
- Milhollen MA, Thomas MP, Narayanan U, Traore T, Riceberg J, Amidon BS, Bence NF, Bolen JB, Brownell J, Dick LR et al (2012) Treatment-emergent mutations in NAEbeta confer resistance to the NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924. *Cancer Cell* 21:388–401

- Miller CP, Ban K, Dujka ME, McConkey DJ, Munsell M, Palladino M, Chandra J (2007) NPI- 0052, a novel proteasome inhibitor, induces caspase-8 and ROS-dependent apoptosis alone and in combination with HDAC inhibitors in leukemia cells. *Blood* 110:267–277
- Miller CP, Manton CA, Hale R, Debose L, Macherla VR, Potts BC, Palladino MA, Chandra J (2011) Specific and prolonged proteasome inhibition dictates apoptosis induction by marizomib and its analogs. *Chem Biol Interact* 194:58–68
- Molineaux SM (2012) Molecular pathways: targeting proteasomal protein degradation in cancer. *Clin Cancer Res* 18:15–20
- Mujtaba T, Kanwar J, Wan SB, Chan TH, Dou QP (2012) Sensitizing human multiple myeloma cells to the proteasome inhibitor Bortezomib by novel curcumin analogs. *Int J Mol Med* 29:102–106
- Nag DK, Finley D (2012) A small-molecule inhibitor of deubiquitinating enzyme USP14 inhibits Dengue virus replication. *Virus Res* 165:103–106
- Nawrocki ST, Griffin P, Kelly KR, Carew JS (2012) MLN4924: a novel first-in-class inhibitor of NEDD8-activating enzyme for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 21:1563–1573
- Neifeld JP, Tormey DC, Baker MA, Meyskens FL Jr, Taub RN (1983) Phase II trial of the dopaminergic inhibitor pimozide in previously treated melanoma patients. *Cancer Treat Rep* 67:155–157
- Nicholson B, Marblestone JG, Butt TR, Mattern MR (2007) Deubiquitinating enzymes as novel anticancer targets. *Future Oncol* 3:191–199
- Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123:773–786
- Opler LA, Feinberg SS (1991) The role of pimozide in clinical psychiatry: a review. *J Clin Psychiatry* 52:221–233
- Orlowski RZ, Kuhn DJ (2008) Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 14:1649–1657
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78:773–785
- Parlati F, Lee SJ, Aujay M, Suzuki E, Levitsky K, Lorens JB, Micklem DR, Ruurs P, Sylvain C, Lu Y et al (2009) Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood* 114:3439–3447
- Pautasso C, Bringhen S, Cerrato C, Magarotto V, Palumbo A (2013) The mechanism of action, pharmacokinetics, and clinical efficacy of carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9:1371–1379
- Peth A, Uchiki T, Goldberg AL (2010) ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation. *Mol Cell* 40:671–681
- Piva R, Ruggeri B, Williams M, Costa G, Tamagno I, Ferrero D, Gai V, Coscia M, Peola S, Massaia M et al (2008) CEP-18770: a novel, orally active proteasome inhibitor with a tumorselective pharmacologic profile competitive with Bortezomib. *Blood* 111:2765–2775
- Popowicz GM, Czarna A, Holak TA (2008) Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Cell Cycle* 7:2441–2443
- Rastogi N, Mishra DP (2012) Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div* 7:26
- Ratia K, Pegan S, Takayama J, Sleeman K, Coughlin M, Baliji S, Chaudhuri R, Fu W, Prabhakar BS, Johnson ME et al (2008) A noncovalent class of papain-like protease/deubiquitinase inhibitors blocks SARS virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16119–16124

- Reverdy C, Conrath S, Lopez R, Planquette C, Atmanene C, Collura V, Harpon J, Battaglia V, Vivat V, Sippl W et al (2012) Discovery of specific inhibitors of human USP7/HAUSP deubiquitinating enzyme. *Chem Biol* 19:467–477
- Rew Y, Sun D, Gonzalez-Lopez De Turiso F, Bartberger MD, Beck HP, Canon J, Chen A, Chow D, Deignan J, Fox BM et al (2012) Structure-based design of novel inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *J Med Chem* 55:4936–4954
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78:363–397
- Richardson PG, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC (2005) New treatments for multiple myeloma. *Oncology (Williston Park)* 19:1781–1792, discussion 1792, 1795–1787
- Roccaro AM, Vacca A, Ribatti D (2006) Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 1:397–403
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761–771
- Schwartz AL, Ciechanover A (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu Rev Med* 50:57–74
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schroter F, Prozorovski T, Lange N, Steffen J, Rieger M et al (2010) Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142:613–624
- Shen M, Schmitt S, Buac D, Dou QP (2013) Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 17:1091–1108
- Sippl W, Collura V, Colland F (2011) Ubiquitin-specific proteases as cancer drug targets. *Future Oncol* 7:619–632
- Song MS, Salmena L, Carracedo A, Egia A, Lo-Coco F, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP (2008) The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network. *Nature* 455:813–817
- Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, Brownell JE, Burke KE, Cardin DP, Critchley S et al (2009) An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 458:732–736
- Soussi T, Beroud C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233–240
- Stebbins JL, Santelli E, Feng Y, De SK, Purves A, Motamedchaboki K, Wu B, Ronai ZA, Liddington RC, Pellecchia M (2013) Structure-based design of covalent Siah inhibitors. *Chem Biol* 20:973–982
- Strobl R (1990) The schizophrenic world view—psychopathologic aspects of ontogenetic regression. *Fortschr Neurol Psychiatr* 58:1–6
- Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1419–1428
- Tanaka K, Kasahara M (1998) The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 163:161–176
- Tanaka K, Waxman L, Goldberg AL (1983) ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin. *J Cell Biol* 96:1580–1585
- Todi SV, Paulson HL (2011) Balancing act: deubiquitinating enzymes in the nervous system. *Trends Neurosci* 34:370–382
- Toth JI, Yang L, Dahl R, Petroski MD (2012) A gatekeeper residue for NEDD8-activating enzyme inhibition by MLN4924. *Cell Rep* 1:309–316

- Tovar C, Graves B, Packman K, Filipovic Z, Higgins B, Xia M, Tardell C, Garrido R, Lee E, Kolinsky K et al (2013) MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Res* 73:2587–2597
- Tsubuki S, Kawasaki H, Saito Y, Miyashita N, Inomata M, Kawashima S (1993) Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1195–1201
- van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BM (2006) FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol* 8:1064–1073
- Ventii KH, Wilkinson KD (2008) Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J* 414:161–175
- Verbrugge SE, Assaraf YG, Dijkmans BA, Scheffer GL, Al M, den Uyl D, Oerlemans R, Chan ET, Kirk CJ, Peters GJ, van der Heijden JW, de Gruijl TD, Scheper RJ, Jansen G (2012) Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno) proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1:174–182
- Vlachostergios PJ, Voutsadakis IA, Papandreou CN (2013) Mechanisms of proteasome inhibitor induced cytotoxicity in malignant glioma. *Cell Biol Toxicol* 29:199–211
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68:1015–1068
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137:413–431
- Wang M, Medeiros BC, Erba HP, DeAngelo DJ, Giles FJ, Swords RT (2011) Targeting protein neddylation: a novel therapeutic strategy for the treatment of cancer. *Expert Opin Ther Targets* 15:253–264
- Watson IR, Irwin MS, Ohh M (2011) NEDD8 pathways in cancer, Sine Quibus Non. *Cancer Cell* 19:168–176 Weissman AM, Shabek N, Ciechanover A (2011) The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:605–620
- Xolalpa W, Perez-Galan P, Rodriguez MS, Roue G (2013) Targeting the ubiquitin proteasome system: beyond proteasome inhibition. *Curr Pharm Des* 19:4053–4093
- Yagishita N, Aratani S, Leach C, Amano T, Yamano Y, Nakatani K, Nishioka K, Nakajima T (2012) RING-finger type E3 ubiquitin ligase inhibitors as novel candidates for the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 30:1281–1286
- Zhang W, Sidhu SS (2014) Development of inhibitors in the ubiquitination cascade. *FEBS Lett* 588(2):356–367. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.003, Epub 2013 Nov 12. Review
- Zhao Y, Morgan MA, Sun Y (2014) Targeting neddylation pathways to inactivate Cullin-RING ligases for anticancer therapy. *Antioxid Redox Signal*. [Epub ahead of print]
- Zhong HJ, Yang H, Chan DS, Leung CH, Wang HM, Ma DL (2012) A metal-based inhibitor of NEDD8-activating enzyme. *PLoS ONE* 7:e49574